Untersuchungen über Wachstumsfaktoren bei Mikro-Organismen

Die Trennung der Wirkstoffe vitaminischer Natur des Weizenkeimes

Inaugural-Dissertation

der philosophischen Fakultät der Universität Bern

zur Erlangung der Doktorwürde

vorgelegt von

Walter Moser

von Großaffoltern (Kt. Bern)

Verlag Paul Haupt Bern 1940

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41547622_0028

Untersuchungen über Wachstumsfaktoren bei Mikro-Organismen

Die Trennung der Wirkstoffe vitaminischer Natur des Weizenkeimes

Inaugural-Dissertation

der philosophischen Fakultät der Universität Bern

zur Erlangung der Doktorwürde

vorgelegt von

Walter Moser

von Großaffoltern (Kt. Bern)

Verlag Paul Haupt Bern 1940

Von der philosophischen Fakultät II der Universität Bern auf Antrag des Herrn Prof. Dr. W. H. Schopfer angenommen.

Bern, den 25. Mai 1939.

Der Dekan:
Prof. H. Greinacher.

R. UNIV.
BIBLIOTHEEK
LEIDEN

Inhaltsverzeichnis

Seite

I. Einleitung und Fragestellung 5

II. Der Weizenkeimextrakt in seiner Wirkung auf Phycomoyces . . . 8

A. Charakterisierung des Weizenkeimes und des Weizenkeimextraktes 8

B. Das Mengenverhältnis der im Weizenkeim und im Weizenkeimextrakt enthaltenen Wirkstoffe 10

C. Besprechung des Wirkstoffbegriffes 12

D. Die Sporenkeimung 13

E. Zygotenbildungsschwelle 15

F. Die Komponenten der Nährlösung 16

1. Die Glucose 16

2. Das Asparagin 17

G. Reinigung des WKE: Zuckerfällung 18

H. Der Einfluß der Wasserstoffionen-Konzentration auf das Wachstum 21

I. Der ökonomische Koeffizient 22

K. Einige Eigenschaften der auf Phycomyces wirksamen Stoffe . . 22

III. Der Weizenkeimextrakt in seiner Wirkung auf Rhizopus 24

A. Einleitung 24

1. Das Vitamin B 1 und seine Komponenten 25

B. Einfluß der Glucosekonzentration 26

C. Der Einfluß der Wasserstoffionen-Konzentration 27

1. Die Citronensäure. (Pufferkomponente) 27

2. Eigentliche Pufferungsversuche 29

D. Die Faktorentrennung mit Tierkohle.
B 1, MP, MR, Bios 32

1. Die Asche des Weizenkeimextraktes 33

2. Die Tierkohleadsorption im Weizenkeimextrakt. Der Faktor MR 34

3. Die asparagin-empfindlichen Mucorineen 37

a) Die Stickstoffwirkung des WKE-Extraktes 37

b) Ersetzung des Faktors „MR" durch Asparagin 38

c) Enthält das Asparagin einen Wirkstoff? 39

d) Andere Stickstoffquellen 41

e) Vergleich allgemeiner Eigenschaften des WKE und des Asparagins 42

4. Die Trennung der Faktoren MP und MR für *Rhizopus chinensis* und *Rhizopus maydis* 44

E. Die Faktorentrennung mit Fullererde.
B 1 und MP, „Bios" und MR 45
1. Methodisches 45
2. Fullererde-Adsorption bei verschiedenem pH 47

F. Oxydation im Weizenkeim-Extrakt mit H_2O_2.
Das Verhalten des Aneurins, der Faktoren MP und MR und des Bios 50

G. Versuche mit Stoffen, die Analogien zum Faktor MR aufweisen 60

IV. Besprechung der Resultate 61

A. Zusammenfassung 66

B. Zahlenbelege zu den Figuren 70

C. Literaturverzeichnis 77

I. Einleitung und Fragestellung

Der Weizenkeim (WK) stellt eine Vitaminquelle dar, welche der Physiologe oft verwendet. Er ist reich an wasserlöslichen Vitaminen B1 und B2, ebenso an fettlöslichen A und D. Daneben ist er eines der vorteilhaftesten Objekte zur Gewinnung des Fortpflanzungsvitamins E. (Die rein chemische Zusammensetzung des WK besprechen wir S. 8).

Es ist bekannt, daß der Pilz, *Phycomyces Blakesleeanus* auf synthetischer Nährlösung nicht wächst; er verlangt einen Wachstumsfaktor vitaminischer Natur (Vitamin B 1 [32]). Hefeextrakte sind besonders reiche Wirkstoffquellen. Die auf *Phycomyces* wirksame Substanz ist reichlich im Weizenkeim enthalten (34,35). Wasserextrakte des Keimes sind besonders wirksam; nach Tierkohlebehandlung verlieren sie ihre Wirkung. Ein Konzentrationsverfahren (34) führt zu einer Anreicherung an wirksamen Faktoren.

Es ist noch nicht bestimmt (1935—36), welchem Faktor die beobachtete Wirkung zuzuschreiben ist. In den Hefeextrakten könnte es das Bios sein oder eine verwandte Substanz, vielleicht die Vitamine B 1 und B 2.

Bis zu diesem Zeitpunkt prüft Schopfer die wirksamen Substanzen hauptsächlich in ihrer Beziehung zur Zygotenbildung von *Phycomyces.*

1934 (36) stellt Schopfer bei *Phycomyces* den wachstumsauslösenden Einfluß des kristallisierten Vitamins B 1 fest; es kann aber noch nicht mit Sicherheit festgestellt werden, ob in der Hefe und dem WKE, die reich an Aneurin sind, dieses Vitamin der einzige Wirkstoff ist.

Wassink 1934 (53) wendet die etwas abgeänderte Bios-extraktionsmethode von Narayanan (19) an zur Darstellung eines Hefe-Extraktes. Er folgert, daß sehr wahrscheinlich dem Bios der Einfluß auf *Phycomyces* zukomme.

Die Methode von Wassink ist auf den Weizenkeim übertragen worden (37). Mit dem so gewonnenen WKE wird *Phycomyces* zu sehr schönem Wachstum aktiviert. Gestützt auf die Eigenschaften des reinen kristallisierten Vitamins B 1 (Löslichkeit, Tierkohleadsorption, Phosphorwolframsäurefällung, Bleiaze-

tatfällung) weist Schopfer nach, daß das Vitamin B 1 noch im WKE vorhanden sein muß. Daher kann das Bios wahrscheinlich nicht für die Wirkung verantwortlich gemacht werden. Ein Reiskleieextrakt (Reiskleie ist bekanntlich das klassische Objekt zur Gewinnung des Aneurins) ist sehr aktiv auf *Phycomyces*.

Nachdem sich der WKE derart wirksam auf *Phycomyces* gezeigt hatte, wird er (39) auf andere *Mucorineen* angewendet. Das Ziel ist dabei, nachzuweisen, ob im WKE mehrere wirksame Stoffe existieren. Zu diesem Zwecke wird untersucht, wie das Aneurin und der WKE denselben Pilz beeinflussen. Es ergibt sich, daß so zwei Pilzgruppen unterschieden werden können. Für die erste ist *Phycomyces* der Typus. Alle Arten dieser Gruppe entwickeln sich auf der verwendeten synthetischen Nährlösung nicht ohne aktiven Stoff. Zur zweiten Gruppe gehören diejenigen *Mucorineen* (zur Hauptsache *Absidia*-Arten), die ohne zugeführten Wirkstoff gedeihen. In beiden Gruppen sind Unterteilungen möglich. Die einen Pilze sind empfindlicher auf reines Aneurin, die andern auf den WKE.

Aus der Tatsache, daß gewisse Pilzarten auf den WKE empfindlich sind und nicht auf das Aneurin, läßt sich folgern, daß wenigstens zwei Faktoren auf die untersuchten *Mucorineen* Einfluß haben. Der eine ist das Vitamin B1, der andere ist davon verschieden.

Relativ wenige *Mucorineen* verlangen Wirkstoffe. Mit Ausnahme von *R. bovinus* reagieren alle untersuchten *Rhizopus*-Arten bemerkenswert ähnlich (43). *Das Vitamin B 1 hemmt ihr Wachstum;* durch WKE werden alle gefördert. Die untersuchten *Rhizopus*-Arten erwecken so den Eindruck einer physiologischen Einheit. Die *Mucorineen*, welche sich wie *Phycomyces* verhalten, sind verschieden empfindlich auf Vitamin B 1 und WKE. Besonders auffällig verhält sich *Pilairia anomala*. Dieser Pilz bildet mit Aneurin fast kein Myzel und nie konnte Luftmyzel beobachtet werden. Dagegen entwickelt er sich gut unter dem Einfluß des WKE.

Von dem in dieser Arbeit festgestellten Gegensatz wird man wiederum zu der Annahme geführt, im WKE sei ein weiterer Faktor enthalten. Dieser wirkt möglicherweise wie das Vitamin B1, wobei der eine Pilz mehr auf das Aneurin, der andere mehr auf diesen Faktor empfindlich ist. Die Trennung der beiden Wirkungen kann nur ausgeführt werden, wenn die beiden Faktoren verschieden wirken.

Den zweiten, durch die physiologische Methode nachgewiesenen Faktor nennt Schopfer (43) Faktor M.

Dieser ganzen Entwicklung voraus und parallel ging der Nachweis, daß die gebräuchlichsten Zucker (32), viele organische N-Verbindungen (39) und eine ganze Reihe von Metallen, darunter alle diejenigen, welche während der WKE-Zubereitung angewendet werden, ohne Wirkung auf *Phycomyces* sind.

Bei den sieben Pilzarten, die wie *Phycomyces* nicht ohne Wirkstoff in synthetischer Nährlösung wachsen, weiß man noch nicht, ob Bedingungen bestehen, unter welchen der Pilz ohne Wirkstoff gedeiht; für *Phycomyces* ist diese Möglichkeit sehr unwahrscheinlich.

Für die von Schopfer untersuchten *Rhizopus*arten ist nicht bekannt, ob die unter dem Einflusse des konzentrierten WKE beobachteten Erscheinungen in jedem Falle einem Wirkstoff zu verdanken sind und ob wir es immer mit demselben zu tun haben. Denn es ist nicht geprüft, wie die Komponenten der Nährlösung das Myzelgewicht beeinflussen. Ebenso ist nicht untersucht worden, ob andere Zucker und N-Verbindungen das Wachstum dieser *Mucorineen* fördern, deshalb kann die Wirkung des WKE nicht genau beurteilt werden. Experimentell festzustellen ist des weitern, ob der Faktor organischer Natur ist und wie eine pH-Veränderung das Wachstum modifiziert. Es ist ferner zu entscheiden, ob der Faktor M zugleich auf *Phycomyces* und *Rhizopus* wirkt.

Uns ist die Aufgabe zuteil geworden (1935), den physiologisch festgestellten Faktor M des WKE, welcher das Wachstum verschiedener *Mucorineen* fördert, in seiner Wirkung und in seinen Eigenschaften zu beschreiben. Dabei ist vor allem zu untersuchen, ob der Faktor für eine bestimmte *Rhizopus*art existiert und ob er ebenfalls *Phycomyces* beeinflußt.

Wir wählten zur Lösung dieser Fragen folgende Pilze: *Rhizopus oryzæ, R. suinus, R. chinensis, R. maydis, Phycomyces Blakesleeanus* und *Saccharomyces cerevisiæ.*

Ich möchte es hier nicht unterlassen, meinem verehrten Lehrer, Herrn Prof. Dr. W. H. Schopfer, für sein ständiges Interesse an meiner Arbeit und für seine anregende Förderung meinen herzlichsten Dank auszusprechen.

Ebenso danke ich für den Beitrag, welcher mir aus dem Eduard Fischer-Fonds des botanischen Institutes zur Drucklegung der Dissertation gewährt wurde.

II. Der Weizenkeim-Extrakt in seiner Wirkung auf Phycomyces

A. Charakterisierung des Weizenkeimes und des Weizenkeim-Extraktes

Bevor wir die Wirkung des Weizenkeimes (WK) und des Weizenkeim-Extraktes (WKE) auf das Wachstum der Mikro-Organismen besprechen, geben wir uns Rechenschaft darüber, welche Verbindungen im ruhenden Weizenkeimling nachgewiesen werden können. Zusammenstellungen über den chemischen Aufbau dieses Pflanzenteiles finden wir z. B. bei Frankfurt 1896 (11) und bei Yoschimura 1911 (55). Hier sei diejenige von Frankfurt angeführt:

Globuline und Albumosen	35,24 %
Cholesterin	0,44 %
Lecithin	1,55 %
Fettes Oel	12,00 %
Raffinose	6,89 %
Glucose Saccharose	24,34 %
Außerdem: Asparagin, Cholin, Betaïn, Allantoin	
Aschenbestandteile	4,82 %
Rohfaser	1,71 %

Eine Bestätigung des Asparagin-Vorkommens finden wir bei Stieger 1913 (52). Barbieri 1914 (3) isoliert aus einem Chloroformauszug einen gelben Farbstoff, den er „Bléin" nennt. Karrer und Salomon 1937 (12) gewinnen aus dem Unverseifbaren des Weizenkeimlingsöls, das biologisch aktive Verbindungen wie Carotinoide und das Vitamin E enthält, ein Tritisterin.

Folgender Arbeitsgang führt zu unserem Weizenkeimextrakt:

1 kg Weizenkeimlinge, trocken.
2 × mit 2 l Aethanol à 80 % ausziehen.
3 × mit 1 l „ „ 50 % „

Unter der Luftpumpe den Alkohol abdampfen. (In der Kälte bildet sich ein gelber Bodensatz).

Im Filtrat: Fällung mit $Ba(HO)_2$.
Im Filtrat: mit H_2SO_4 pH 6,8 herstellen.
Im Filtrat: Fällung mit Bleiazetat.
Im Filtrat: Pb mit H_2S fällen.
Filtrat zum fertigen Extrakt auf dem Wasserbad eindicken.

Diese Zubereitung stellt einen Teil der Technik dar, welche Wassink in etwas abgeänderter Form von Narayanan und Drummond übernommen hat. Von diesen Autoren wurde sie zur Darstellung des Bios ausgearbeitet. Die wichtigsten Stufen dieser Zubereitung sind: Die Extraktion mit Alkohol, die Fällung der Proteide mit $Ba(OH)_2$ und die des Vitamins B2 mit Bleiazetat.

Der WKE ist nie auf seine Zusammensetzung untersucht worden. Daher müssen wir uns auf folgenden Hinweis beschränken: Im WKE befinden sich alle Verbindungen des WK, die mit Baryt nicht gefällt werden, ferner diejenigen, welche von den bei den verschiedenen Neutralisationen entstehenden Niederschlägen nicht mitgerissen werden. Der WKE enthält im Gegensatz zum WK Essigsäure. Diese entsteht bei der Pb-Fällung und hydrolysiert bei der weitern Zubereitung des Extraktes einen Teil der Saccharose. (Nach Frankfurt ist Saccharose der Hauptzucker des WK). In einem Extrakt bestimmten wir 27 % reduzierende Zucker, in einem anderen nur 8 %, während eine Säureinversion 70 % lieferte.

Wir haben sieben WKE hergestellt (aus verschiedenen WK-Lieferungen der Mühle). Diese Wirkstoffmenge brauchten wir, um die in dieser Arbeit beschriebenen Versuche auszuführen. Wenn wir die Wirksamkeit aller Extrakte vergleichen, sehen wir, daß jeder Extrakt das Wachstum von *Phycomyces Blakesleeanus* und *Saccharomyces cerevisiæ* auslöste und dasjenige der *Rhizopus*-Arten förderte. Aus derselben Menge WK konnten wir nie dieselbe Menge WKE gewinnen, weil wir den Zeitpunkt, bei dem wir mit dem Eindicken zum Sirup aufhörten, abschätzen mußten.

Wenn wir einen neuen WKE gewonnen hatten, führten wir zusammen mit dem alten einen Kontrollversuch durch, um die Konzentration der Wirkstoffe in den beiden Extrakten zu ver-

gleichen. Bei *Phycomyces* konnten beobachtete Gewichtsunterschiede der Myzelien auf Konzentrationsunterschiede der Wirkstoffe in den WKE zurückgeführt werden. Bei den *Rhizopus*-Arten war uns etwas Aehnliches nicht möglich, da diese Unregelmäßigkeiten im Wachstum zeigen, die wir nicht erklären können. In der Wirkung der WKE auf *Rhizopus oryzae* macht der vierte Extrakt eine Ausnahme, die wir bei der Trennung der Wirkstoffe durch Tierkohleadsorption näher besprechen werden.

B. Das Mengenverhältnis der im Weizenkeim und im Weizenkeimextrakt enthaltenen Wirkstoffe

Wir haben uns folgende Frage vorgelegt: In welchen Mengen WK und WKE sind gleiche Quantitäten Wirkstoffe enthalten? Zu ihrer Beantwortung haben wir Weizenkeime möglichst fein gepulvert und in verschiedenen Mengen Wasser aufgeschwemmt. Von jeder Suspension fügten wir abgemessene Volumen ($^5/_{100}$—8 ccm) zu 25 ccm Nährlösung (NL).

Diese Nährlösung hat in allen Versuchen, wenn nichts Besonderes gesagt ist, folgende Zusammensetzung: 5 % Glucose, 1 ‰ Asparagin, 0,5 ‰ $MgSO_4$, 1,5 ‰ KH_2PO_4. Für unsere Versuche verwenden wir meistens Erlenmeyer à 150 ccm, in die wir die Nährlösung und die Lösungen mit den Wirkstoffen einfüllen. Wenn die Erlenmeyer so vorbereitet sind, sterilisieren wir sie 15 Minuten bei 115°. Nach dem Erkalten impfen wir die Lösung.

Zu unseren Figuren ist allgemein Folgendes zu sagen: Auf der Ordinate tragen wir die erzielten Trockengewichte der Myzelien in mg ein. Auf der Abszisse geben wir die verabreichten Mengen Wirkstofflösung in ccm an. Diese Mengen sind im Abstande ihrer mit einer bestimmten Zahl multiplizierten Logarithmen aufgetragen. Dadurch erreichen wir, daß die kleinen Volumina in der Darstellung auseinander rücken.

In Figur 1 sind die Resultate derjenigen WK-Suspensionen graphisch dargestellt, welche in ihrer Wirkung am besten mit dem WKE übereinstimmen.

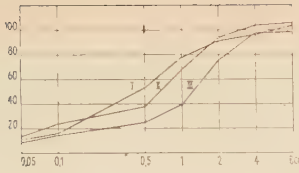


Fig. 1. Wachstum von *Phycomyces* als Funktion des WKE $^{1}/_{100}$ (II) u. zweier WK-Suspensionen : I—20 mg, III = 40 mg WK auf 160 ccm Wasser.

In einer Aufschwemmung kleben auch bei gutem Schütteln immer Teilchen zusammen. Es ist deshalb unmöglich, in kleinsten Raumteilen gleiche Stoffmengen zu haben. Daraus erklären wir die abweichenden Trockengewichte, die *Phycomyces* lieferte, wenn der Nährlösung kleinste, aber gleiche Mengen derselben Suspension zugeführt wurden.

An Hand der Gewichtsmengen können wir die rechnerischen Beziehungen herstellen. Wir vergleichen die Trockenrückstände. Den darin in kleinsten Mengen enthaltenen Wirkstoffen schreiben wir die wachstumsfördende Wirkung zu.

Tabelle 1

Wirkstoffmengen in	ccm	$^{5}/_{100}$	$^{1}/_{10}$	$^{5}/_{10}$	1	2	4	8
WKE, Trockenrückstände	mg	0,445	0,89	4,45	8,89	17,8	35,5	71,1
Rückstände der Suspension	mg	0,4	0,8	4	8	16	32	64

In Tabelle 1 sind die Trockengewichte der WK-Suspension und des WKE zusammen gestellt. Entsprechende Gewichte lösen bei *Phycomyces* ungefähr dasselbe Wachstum aus. Die Trockengewichte sind in mg angegeben, die Wirkstoffmengen in ccm.

Wenn wir entsprechende Trockengewichte der Tabelle 1 zueinander ins Verhältnis setzen und den Wert des Bruches ausrechnen, erhalten wir fast bei jeder Division den Quotienten 1. Das heißt, daß der WK und der WKE ungefähr dieselbe Wirkstoff-Konzentration besitzen.

Erinnert man sich, daß im Verlaufe der Extraktzubereitung eine große Menge Proteide gefällt wird und bedenkt man zugleich, wie viel reduzierender Zucker schlußendlich im Extrakt nachgewiesen werden konnte, so ist man in der Lage, den Extrakt einigermaßen zu beurteilen. Vom WK zum WKE findet demnach eine einseitige Konzentrationsverschiebung der verschiedenen Verbindungen statt, wobei die Zucker stark bevorzugt werden. Der Extrakt stellt demnach nur eine sehr praktische Form

des Weizenkeimes dar. Dem WKE fehlen verschiedene Substanzen, die ursprünglich im WK enthalten waren: Vitamin B2, Proteide usw. Die Form ist also einfacher geworden und erleichtert uns dadurch wesentlich die Bestimmung der Wirkstoffe.

Folgende Berechnung läßt uns die Wirkstoff-Kapazität des fertigen WKE abschätzen. Wir führen sie an unserem vierten Extrakt aus. Aus 1'000 g WK gewannen wir 160 g WKE. Fragen wir uns nun, wievielmal in diesen Gewichten z. B. 8 mg Trockensubstanz enthalten sind (welche je ein Pilztrockengewicht von ca. 70 mg ermöglichen), so finden wir im WK den Faktor 125'000 und im WKE den Faktor 20'000. Das heißt: Mit dem in 1 kg WK enthaltenen Wirkstoff können wir 6mal mehr *Phycomyces*-Myzel erzeugen. Es gehen bei der Extraktbereitung demnach ca. 75% der wirksamen Substanz verloren.

Schopfer und Jung 1936 (28) bestimmten mit dem Tiertest (Ratte), daß ein Gramm unseres Extraktes 5,5 internationale Einheiten (= 11 γ) Aneurin enthält.

C. Besprechung des Wirkstoffbegriffes

Es ist des öftern gezeigt worden, daß ein WKE einen Wirkstoff enthält, den *Phycomyces* zu seiner Entwicklung benötigt. Ein solcher Extrakt besitzt schon in sehr kleiner Dosis die Fähigkeit, das Wachstum in streng synthetischer Nährlösung auszulösen. Die nach unserer Methode hergestellten Extrakte enthalten außerdem eine große Zuckermenge und besitzen deshalb eine sirupöse Konsistenz. Die Zucker: Saccharose, Raffinose und Glucose (Frankfurt) besitzen keine Wirkstoff-Funktionen bei *Phycomyces;* aber sie beladen den Extrakt und erhöhen die dem Milieu zugeführte Trockensubstanz. Solange daher der Wirkstoff nicht isoliert ist und in Kristallform vorliegt, ist es von Vorteil, wenn man sich eines möglichst konzentrierten und gereinigten Extraktes bedient.

Der Begriff Wirkstoff gibt häufig Anlaß zu Uebertreibungen. Solange es nicht möglich ist, genaue Beziehungen zwischen dem Gewicht des aktiven Faktors und dem erzielten Trockengewicht des Pilzes herzustellen und solange man nicht die minimale und die maximale Dosis des wirksamen Stoffes kennt, muß man immer befürchten, es mit einem gewöhnlichen Nährstoff zu tun zu haben. Eine große Zahl unserer Versuche, welche zu diesem Pro-

blem in Beziehung stehen und die mit Roh-Extrakten ausgeführt worden sind, werden in diese Kritik einbezogen.

Wenn man, wie es für unsere Extrakte der Fall ist, die Natur der aktiven Substanzen nicht kennt und wenn diese Stoffe einer größeren Menge banaler Substanzen beigemengt sind, dann bestimmen wir den Trockenrückstand des Extraktes. Beobachten wir dabei eine begrenzte Substanzmenge, die uns erlaubt, an einen Wirkstoff zu denken, dann gehen wir in den Folgerungen weiter und sagen uns, daß der aktive Faktor nur einen winzigen Teil des totalen Trockenrückstandes ausmachen werde. Letzterer stellt ein maximales Gewicht, eine obere Grenze, dar. Wenn nun dieser Trockenrückstand innerhalb der Mengengrenze liegt, welche man dem Wirkstoff zugestanden hat, dann wird man annehmen, daß ein Wirkstoff existiert und daß der in Frage kommende Extrakt nicht in plastischer oder energetischer Art in die Funktionen des Organismus eingreift.

Welches sind nun die Grenzen, innerhalb welcher man von einem Wirkstoff sprechen kann? Dafür lassen sich keine definierten Größen angeben. Die Frage muß für jeden Fall gesondert entschieden werden. Wir können nur sagen: je kleiner die aktive Dosis gegenüber dem erreichten Effekt ist, desto größer ist auch die Wahrscheinlichkeit für das Eingreifen einer auxogenen Substanz vitaminischer Natur.

Wir betrachten eine organische Verbindung dann als Wirkstoff, wenn ein Mißverhältnis besteht zwischen der aktiven Dosis und dem erzielten Trockengewicht des Pilzes oder zwischen der Menge aktiver Substanz und der Menge Nährstoffe, deren Assimilation ermöglicht wird. Für die Bildung von 1 mg Substanz benötigt *Phycomyces* unter definierten Bedingungen 5×10^{-6} mg Aneurin.

D. Die Sporenkeimung

Wir wissen, daß das Wachstum von *Phycomyces* in synthetischer Nährlösung durch Extrakte aus den verschiedensten Stoffen ausgelöst wird. Wir nennen hier einige Beispiele: Maltose Kahlbaum, *Orchideenpollinien,* Urin, Weizenkeim, *Phycomyces*-Myzel, Myzelien der II. Gruppe, auxo-autotrophe Pilze, *(Absidia).* Sehr schöne Resultate erhält man bekanntlich mit reinem Aneurin. Wie das Myzel von *Phycomyces,* so besitzen auch die

Sporen einen Wirkstoff, der die Keimung sichert. Den Beweis dafür liefert Schopfer 1935 (45). Er suspendiert 228 Millionen Sporen in 100 ccm Wasser und autoklaviert diese Aufschwemmung. Der Trockenrückstand beträgt 0.17%. Wenn zu 25 ccm Nährlösung 33.8% Trockensubstanz gegeben wurden, so bildeten sich nach normaler Impfung 51 mg Trockenmyzel, in der Kontrolle 3 mg.

Unter diesen Voraussetzungen und angeregt durch Almoslechner, welche zeigte, daß ihr Hefewuchsstoff die Generationsdauer der Hefe verkürzt, fragten wir uns, ob unser WKE vielleicht ähnlich auf die Keimungsgeschwindigkeit der Sporen von *Phycomyces* wirke. Bei Almoslechner war die in einer bestimmten Zeit gebildete Zellenzahl maßgebend für die Beurteilung des Wirkstoffes. Wir nahmen als Kriterium die Prozente der innerhalb der Keimungszeit gekeimten Sporen. Als azellularer Organismus eignet sich *Phycomyces* nicht für den Nachweis der Zellteilungshormone.

Zu den Versuchen verwendeten wir unsere gewöhnliche Nährlösung mit 2% Agar. Von dieser Grundlösung gaben wir auf verschiedene Erlenmeyer je 25 ccm und dazu verschiedene Mengen ($^5/_{100}$—8 ccm) des hundertmal verdünnten WKE I. Das Ganze wurde, wie üblich, 15 Minuten bei 115° autoklaviert. In sterilisierten Petrischalen befestigten wir mit dem gleichen Medium zwei Stückchen Glasrohr, als Stützen eines Deckglases von 22 × 34 mm, dessen eine Seite mit dem beschriebenen Nährboden überdeckt war. Auf diesen dünnen Nährboden brachten wir einen Tropfen einer Suspension von *Phycomyces*-Sporen.

Tabelle 2: Die Sporenkeimung von Phycomyces unter dem Einfluß des 100 × verdünnten WKE.

Zugefügter Wirkstoff in ccm	0	$^5/_{100}$	$^1/_{10}$	$^5/_{10}$	1	8	Reihe
Prozente gekeimter Sporen	55	56	50	42	69	70	1
„ „ „	53	60	41	63	72	60	2
„ „ „	62	60	52	56	65	72	3
„ „ „	55	63	55	57	65	66	4
Mittelwert	56	60	50	55	68	67	—

Die in Tabelle 2 zusammengestellten Resultate sind aus Mikrophotographien berechnet worden. Wir sehen in keiner Reihe ein regelmäßiges Ansteigen der Prozente gekeimter Sporen, wie es

der Fall sein müßte, wenn die Sporenkeimung eine Funktion der Menge des zugeführten Wirkstoffes wäre. Auch in den Mittelwerten konstatieren wir keine regelmäßige Zunahme der gekeimten Sporen. Derjenige der maximalen Wirkstoffmenge ist allerdings um etwa 10% größer als derjenige der Kontrolle. Dieses Resultat steht aber in keinem Verhältnis zum späteren Wachstum unter dem Einfluß des Vitamins.

Die Experimente mit den Sporen bestätigen die Feststellung, daß diese genug Wirkstoff enthalten, um keimen zu können, aber zu wenig für ihr späteres Wachstum.

Kerl 1937 (13) berichtet über Versuche an *Pyronema confluens*. Mit Heteroauxin gelingt es ihr, im Durchschnitt 42% mehr Sporen zur Keimung zu bringen als in den Kontrollen. Förderung des Myzelwachstums erzielt sie mit Auxin, Bios, Aneurin und besonders auch mit Heteroauxin. Alle diese Substanzen begünstigen ebenfalls die Anlage von Apothecien. Heteroauxin bewirkt die stärkste Aktivierung.

E. Zygotenbildungsschwelle

Unter Schwellenwert verstehen wir die kleinste Menge Wirkstoff, welche notwendig ist, um *Phycomyces* zu veranlassen, seine ersten Zygoten zu bilden. Wir untersuchen hier die Zygotenbildung als Funktion unseres WKE.

Wir kultivierten *Phycomyces* zu diesem Zwecke in Petrischalen. Unserer gewöhnlichen Nährlösung setzten wir 2% Agar zu und den einzelnen Schalen den Wirkstoff in abgestuften Mengen. Das so zubereitete Milieu sterilisierten wir wie üblich 15 Minuten bei 115°. Die Impfung wurde mit einem Plus- und einem Minusstamm von *Phycomyces* ausgeführt. Zu diesem Zwecke impften wir längs einer Linie die Sporensuspension des einen Geschlechtes und im Abstand von ca. 3 cm die des andern. Nach acht Tagen photographierten wir die Schalen. (Die Photographien sind auf Seite 16 zusammengestellt).

Das Luftmyzel tritt hier schon bei der kleinsten Wirkstoffmenge auf. Sie beträgt $^5/_{100}$ ccm des 100mal verdünnten WKE. Der mit diesem Volumen verabreichte Trockenrückstand wiegt 444 γ. Bei diesen Stämmen sehen wir auch einen Unterschied im zeitlichen Auftreten des Plus- und des Minus-Luftmyzels. Hier

gehören die ersten Sporangienträger dem Plus-Stamm an. Die Zygotenbildungsschwelle befindet sich erst bei der für die Entwicklung von *Phycomyces* optimalen Wirkstoffmenge, d. h. bei 1 ccm des Extraktes I in der Verdünnung 1 : 100. Die zugeführte Trockensubstanz beträgt 8,89 mg. Die Zygotenbildung erfordert demnach eine größere Menge Wirkstoff als die Luftmyzelbildung. Die Ursache wird zum Teil wahrscheinlich darin zu suchen sein, daß die Geschlechtsphase mit einem größeren Stoffumsatz verbunden ist, der ebenso einer erhöhten Menge Wirkstoff zu seiner Aktivierung bedarf. Daneben wird aber ein Teil der Wirkstoffe direkt für die gleichzeitig stattfindende asexuelle Vermehrung verbraucht. In dem Werte 1 ccm sind daher die Wirkstoffmengen von 2 Vorgängen (Wachstum und Zygotenbildung) vereinigt.

F. Die Komponenten der Nährlösung

1. Die Glucose

Bevor wir an unsere Aufgabe herantreten, verfolgen wir den Einfluß, den die wichtigsten Komponenten unserer Nährlösung auf die Bildung des Pilzmyzels ausüben. Wir suchen daraus Anhaltspunkte zu gewinnen, um den WKE in seiner Wirkung beurteilen zu können; denn er enthält auch Nährstoffe, neben Wirkstoffen.

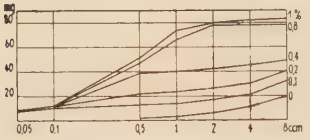


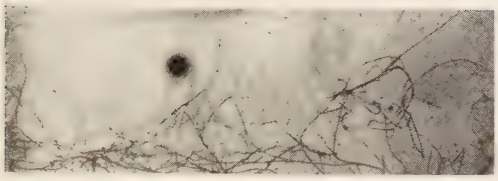
Fig. 2. Einfluß der Glucose-Menge auf das Myzel-Gewicht von *Phycomyces*. Auf der Ordinate rechts die Glucosemenge in Prozenten.

Aus Figur 2 geht die Abhängigkeit des Pilzwachstums von der Glucose-Konzentration (0—1 %) hervor. Die Zusammensetzung der Nährlösung ist mit Ausnahme der Glucose die übliche. Wir sehen in den niedrigen Konzentrationen ein ziemlich regelmäßiges Ansteigen der Myzelgewichte mit der Glucose-Menge. 1 % Glucose stellt unter unseren Bedingungen schon eine optimale Konzentration dar. In einem anderen Versuche variierten wir die Glucose-Menge zwischen 1 und 10 %. Innerhalb dieser Grenzen hat die Glucose-Menge keinen Einfluß auf das Myzelgewicht. „Ohne" Glucose wächst *Phycomyces* deshalb, weil entsprechende Zucker mit dem WKE zugeführt werden. Unserer normalen Nähr-

Zu Seite 15

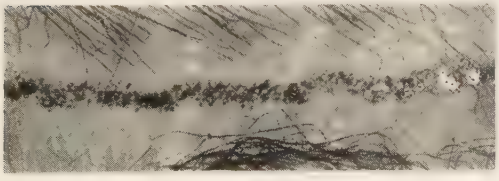
I. Kontrolle.

II. $^{5}/_{100}$ ccm WKE $^{1}/_{100}$, Trockensubstanz (TS) 445 γ.



III. $^{5}/_{10}$ ccm WKE $^{1}/_{100}$, TS : 4,45 mg.

IV. 1 ccm WKE $^{1}/_{100}$, TS : 8,89 mg Zygotenbildungsschwelle.



V. 8 ccm WKE $^{1}/_{100}$, TS : 71.12 mg.

lösung setzen wir 5% Glucose zu, um dem Pilz einen Zuckervorrat für längere Atmung zu geben. Die Zucker, welche die Nährlösung mit dem WKE erhält, können daher nicht mehr zur Geltung gelangen.

2. Das Asparagin

Fig. 2 zeigt die relativ starke Abhängigkeit des Myzelwachstums vom Glucose-Gehalt der Nährlösung.

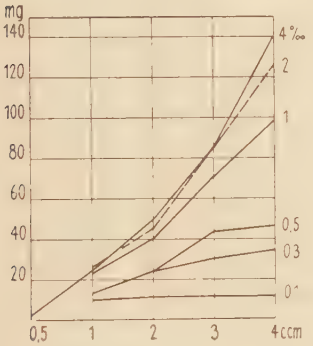


Fig. 3. Einfluß der Asparaginkonzentration (0—4 ‰) auf das Myzelgewicht von *Phycomyces*.
Ordinate: Trockengewichte der Myzelien in mg. Asparagin in ‰.
Abszisse: Mengen WKE 1 : 100 in ccm. (auf der Abszisse: 0,5; 1; 2; 4; 8 anstatt 3; 4)

Betrachten wir nun aber Fig. 3, welche den Einfluß der Asparaginkonzentration der Nährlösung illustriert, so sehen wir, wie viel schärfer sich die Aenderung des Asparagin-Gehaltes im Trockengewicht von *Phycomyces* ausdrückt. Ein rechnerischer Vergleich ergibt, daß der Pilz unter den beschriebenen Bedingungen auf die Asparagin-Menge 10—12mal empfindlicher ist als auf die Glucose-Menge. In diesem Versuch ist die Stickstoffquelle die einzige veränderte Komponente des Milieus. Aus Figur 3 läßt sich entnehmen, daß das Asparagin in unserer Nährlösung bei der verwendeten WKE-Menge nicht in optimaler Konzentration enthalten ist. Zwischen zwei und vier pro mille Asparagin besteht fast Wirkungsgleichheit. Das bedeutet sehr wahrscheinlich, daß die zugefügte Menge Wirkstoff nur die Aufnahme einer begrenzten Asparagin-Menge erlaubt. Hätten wir es mit einer optimalen Stickstoff-Konzentration zu tun, dann müßte die Gewichtskurve eine Abflachung zeigen.

Die WKE sind ziemlich stickstoffreich. Der unverdünnte WKE enthält ca. 1,4% N. Wir erklären damit die verschiedene Kurven-Form, welche man bei einer graphischen Darstellung der Myzelgewichte erhält, je nachdem, ob man das Aneurin oder den WKE als Wirkstoff verwendet hat. Mit dem Vitamin B1 erzielt

man eine Optimum-Kurve. Die mit dem WKE erzeugte Kurve steigt nach einem annähernd maximalen Wert langsam weiter an, weil mit der größeren Wirkstoffmenge zusätzlicher N in die Nährlösung gebracht wird.

Wie sich *Phycomyces* entwickelt, wenn die Nährlösungen in der Asparagin-Konzentration verschieden sind, haben wir während 10 Tagen verfolgt. In diesem Zeitversuche war die Menge des Wirkstoffes konstant. 25 ccm Nährlösung enthielten 4 ccm WKE 1 : 100.

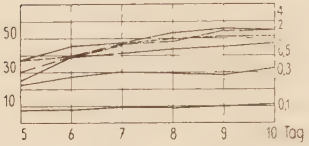


Fig. 4. Wachstum von *Phycomyces* als Funktion der Asparaginkonzentration und der Zeit.
Abszisse: Pilzgewicht in mg.
rechts: Asparaginkonzentration in ‰.

Aus Figur 4 läßt sich entnehmen, daß bei geringen Asparagin-Mengen (bis 0.3 ‰) das Wachstum ein stetiges und allmähliches ist. In höheren Konzentrationen verläuft es rascher. Das Maximum wird am 9. und 10. Tag erreicht.

Wenn man sieht, wie sehr die Myzelgewichte von *Phycomyces* durch die Variation des Asparagingehaltes beeinflußt werden, muß man sich fragen, ob nicht vielleicht die wirksame Substanz unseres WKE durch eine in ihm enthaltene Stickstoff-Verbindung ersetzt werden könne. Bei *Phycomyces*, mit dem eine große Zahl stickstoffhaltiger Verbindungen untersucht worden ist, scheint uns diese Möglichkeit nicht sehr wahrscheinlich. Es hält natürlich schwer, sie mit Sicherheit auszuschalten, da es unmöglich ist, alle bekannten N-Verbindungen zu untersuchen. Immerhin sind die wichtigsten biologischen N-Verbindungen angewendet worden (Aminosäuren, Di- und Tripeptide, Peptone, Amine und Ammoniumsalze), sodaß mit ziemlich großer Wahrscheinlichkeit angenommen werden darf, daß die Wachstumsauslösung nicht der gewöhnlichen Stickstoffwirkung zugeschrieben werden muß.

G. Reinigung des WKE: Zuckerfällung

Zuckerbestimmungen im WKE haben uns gezeigt, daß er reich an Zucker ist. Ebenso ließ im voraus seine sirupöse Beschaffenheit darauf schließen. Um mit größerer Wahrscheinlichkeit die Aktivierung von *Phycomyces* einem Wirkstoff zuschreiben zu

können, haben wir darnach getrachtet, unsern Extrakt von denjenigen Substanzen zu befreien, die nach unserem Dafürhalten ohne auxogene Wirksamkeit sind. Dazu gehören vor allem die den Extrakt beladenden Zucker. In der Methode von Baba 1935 (2) haben wir eine Möglichkeit gefunden, die im WKE vorkommenden Zucker aus einer Lösung als Saccharate zu fällen. Die Zucker werden in methyl-alkoholischer Lösung durch Baryt gefällt. Der WKE wird zu diesem Zwecke zehnmal verdünnt und in Methanol gelöst. Er bildet mit dem Baryt einen reichlichen gelben Saccharat-Niederschlag. Dieser enthält fast allen Farbstoff des WKE. Der beinahe entfärbte Extrakt wird mit Schwefelsäure behandelt, bis ein pH von 5—6 erreicht ist. Auf diese Weise wird der Ueberschuß an Baryt entfernt. Das ausgefallene Saccharat wird mehrmals mit Methanol gewaschen. Die Fraktionen werden vereinigt, der Alkohol abgedampft und der Rückstand mit Wasser auf das Volumen gebracht, welches der zur Fällung verwendete WKE in der Verdünnung 1 : 100 besitzt. Das Saccharat selber wird in Wasser suspendiert, mit CO_2 behandelt und auf die Verdünnung des WKE 1 : 100 gebracht.

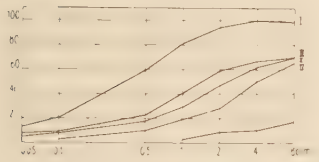


Fig. 5. Wirkung des WKE und der Produkte der Zukkerfällung auf das Wachstum von *Phycomyces*.
I = WKE, II WKE nach Zuckerfällung, III – WKE nach Zuckerfällung + Waschprodukt aus dem Saccharat, IV = Waschprodukt, V = regenerierter Zukker (unterste Kurve).

Figur 5 zeigt, wie die Wirkstoff-Mengen nach der Zuckerfällung verteilt sind. Dieses Experiment demonstriert zugleich, daß den im Extrakt vorkommenden Zuckern keine auxogene Wirkung zukommt. Wir haben die Zucker-Fällungen fortgeführt und sind zu einem Reinigungs-Produkt gelangt, welches 4—5mal weniger Wirkstoff enthielt als der rohe WKE. Zu gleicher Zeit ist aber der Trockenrückstand des Extraktes um das Elffache gesunken. In Figur 6 sind die mit diesem Produkt erhaltenen Myzelgewichte verwendet.

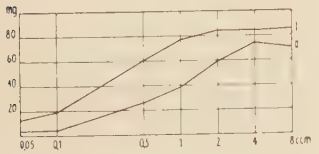


Fig. 6. Wachstum von *Phycomyces* als Funktion des WKE nach Zuckerfällung. I WKE, II = WKE nach Zuckerfällung + Waschprodukt der Zuckerfällung.
Ordinate : Myzel-Trockengewicht in mg.
Abszisse : Mengen Wirkstoff in ccm.

In 1 ccm der in Figur 6 angeführten Wirkstoff-Lösungen befinden sich folgende Trockenrückstände: in Lösung I: 8.89 mg, in Lösung II: 0.8 mg. Es ist nun interessant auszurechnen, welche Mengen Trockenrückstand der Extrakte notwendig sind, um 1 mg Trockenmyzel zu erzielen. Dabei setzen wir voraus, daß nur ein Bruchteil des errechneten Wertes tatsächlich aus Wirkstoff besteht. Wir haben diese Werte ausgerechnet vom Momente an, wo sich der Einfluß der Extrakte I und II bemerkbar macht, bis zum Augenblick, wo das Maximum des Trockengewichtes erreicht ist. Die Werte sind in den Tabellen 3 und 4 zusammengestellt. Was bei weiterer Wirkstoff-Zugabe geschieht, wird hier nicht verfolgt, da die Wirkstoffmenge nicht mehr in direktem Verhältnis zum gebildeten Myzel steht, wie uns Versuche mit Aneurin zeigen. Von einer optimalen Dosis an übt eine erhöhte Menge Vitamin B 1 keinen weiteren Einfluß auf das Wachstum aus; wir erhalten eine abgeflachte Kurve. Wenn bei der Kurve des WKE noch eine schwache Gewichtszunahme festzustellen ist, so hat das seinen Grund in der vermehrten Stickstoffzugabe.

Tabelle 3: Berechnung der Menge Trockenrückstand des WKE, welche *Phycomyces* benötigt zur Synthese von 1 mg getrocknetem Myzel. (Extrakt A = WKE 1 : 100, vor Zuckerfällung).

Wirkstoffmengen	in ccm	$^5/_{100}$	$^1/_{10}$	$^5/_{10}$	1	2
Gebildetes Myzel	in mg	13	19	60	77	84
Trockenrückstand im WKE	in mg	0,445	0,89	4,45	8,89	17,78
— zur Bildung von 1 mg Trockenmyzel	in mg	0,034	0,046	0,073	0,115	0,211

Tabelle 4: Dieselben Angaben wie in Tabelle 3 für den WKE *nach* Zuckerfällung (Extrakt B = WKE 1 : 100, nach Zuckerfällung).

Wirkstoffmengen	in ccm	$^5/_{100}$	$^1/_{10}$	$^5/_{10}$	1	2	4
Gebildetes Myzel	in mg	4	4	26	38	59	74
Trockenrückstand im WKE	in mg	0,04	0,08	0,4	0,8	1,6	3,2
— zur Bildung von 1 mg Trockenmyzel	in mg	0,01	0,02	0,05	0,02	0,03	0,04

Diese Zahlen haben nur eine sehr relative Bedeutung, da wir nur den Trockenrückstand des Extraktes kennen. Dieser ist viel zu groß im Verhältnis zur darin enthaltenen aktiven Substanz.

Wir nehmen vorläufig an, im WKE sei vor allem das Aneurin wirksam. Wir wissen, welche Mengen des reinen kristallisierten Aneurins notwendig sind, um dieselben Resultate zu erzielen wie mit dem Extrakt B. Ebenso kennen wir die Trockenrückstände von B, worin der Wirkstoff enthalten ist. Die entsprechenden Trockenrückstände beider Wirkstoff-Lösungen sind in Tabelle 5 zusammengestellt.

Tabelle 5: Die Trockenrückstände des Extraktes B und die Aneurin-Mengen, welche dasselbe Wachstum von *Phycomyces* auslösen.

Wirkstoffmengen in ccm		$^5/_{100}$	$^1/_{10}$	$^5/_{10}$	1	2	4
Trockenrückstände in Extrakt B	in mg	0,04	0,08	0,4	0,8	1,6	3,2
Aneurin	in γ	0,01	0,02	0,1	0,2	0,4	0,8

Nach dieser Tabelle sind die Trockenrückstände des Extraktes B 4000mal größer als die Aneurin-Menge, welche dieselbe Wirkung besitzt.

H. Der Einfluß der Wasserstoffionen-Konzentration auf das Wachstum

Die Versuche mit *Phycomyces* wurden mit folgenden Puffern ausgeführt: HCl-biphtalat, NaOH-biphtalat, NaOH-biphosphat.

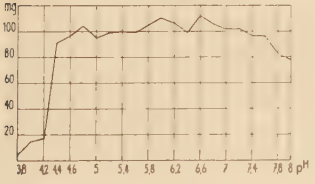


Fig. 7. Wachstum von *Phycomyces* als Funktion des pH (WKE $^1/_{100}$, 4 ccm.)

Die erhaltene Kurve zeigt, daß das Optimum sich über weite pH-Werte erstreckt. Es stellt sich sehr rasch bei pH4 ein und bleibt bestehen bis pH7, dann nimmt das Myzelgewicht langsam ab. Wir haben aber noch ein hohes Gewicht bei pH8. Diese Erscheinung steht im Gegensatz zu einigen *Rhizopus*-Arten. Ihr Wachstums-Optimum ist gegen den sauren Bereich des Puffers verschoben. Interessant ist nun, daß die Kurve fast genau mit derjenigen übereinstimmt, welche *Phycomyces* unter denselben Bedingungen liefert, wenn sein Wachstum mit Aneurin ausgelöst wird.

I. Der ökonomische Koeffizient

Darunter verstehen wir das Verhältnis zwischen dem gebildeten Trockengewicht des Pilzes und der dazu verbrauchten Glucose. *Phycomyces* wurde wie üblich gezüchtet. In der Nährlösung setzten wir die Glucose auf ein Minimum (1,2 %) herab, damit wir die Zuckerbestimmung in einer möglichst großen Menge der Nährlösung ausführen konnten. Wir setzten Serien an mit steigenden Mengen Wirkstoff (Weizenkeimextrakt nach Zuckerfällung, Verdünnung 1 : 100). Das Wachstum dauerte für die ganze Serie 7 Tage.

Tabelle 6: Die Werte zur Berechnung des ökonomischen Koeffizienten bei *Phycomyces*.

Wirkstoff-Lösung in ccm	1/10	5/10	1	2	4	8
Glucose-Verbrauch in mg	10	34,6	69,2	98,4	143,5	175,5
Getrocknetes Myzel „ mg	3,7	12,8	25,0	33,8	52,0	64,4
Oekonomischer Koeffizient	0,37	0,36	0,36	0,34	0,36	0,36

Der ökonomische Koeffizient ist also eine Konstante für jede Menge gebildeten Myzels und ist unabhängig von der Wirkstoffmenge.

K. Einige Eigenschaften der auf Phycomyces wirksamen Stoffe

Wir prüfen das Verhalten des WKE gegenüber der Bestrahlung mit ultraviolettem Licht und gegenüber einer Ultra-Filtration.

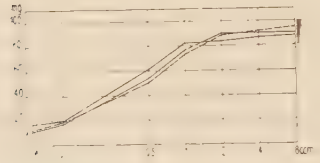


Fig. 8. Wachstum von *Phycomyces* nach Ultraviolett-Bestrahlung des WKE.
I = WKE unbehandelt, 1 : 100. II = WKE nach Ultraviolett-Bestrahlung, 16 Stunden. III = WKE nach Ultraviolett-Bestrahlung, 32 Stunden.

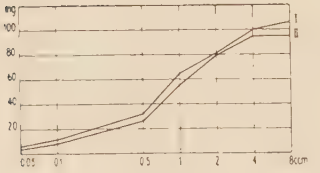


Fig. 9. Wachstum von *Phycomyces* nach Ultrafiltration des WKE. I = WKE unbehandelt. II = WKE ultrafiltriert.

Figur 8 und 9 zeigen, daß es unmöglich ist, den wirksamen Faktor des WKE durch Bestrahlen mit ultraviolettem Licht zu zerstören oder zu aktivieren. Ebenso gelingt es mit Ultrafiltern von verschiedener Porenweite (Membranfiltergesellschaft) nicht, den Wirkstoff aus der Lösung zu entfernen.

Zusammenfassend läßt sich Folgendes sagen: Die verschiedenen Weizenkeimextrakte stimmen — mit Ausnahme des vierten — in ihrer Wirkung auf unsere Teste überein. Der vierte WKE erreicht erst nach der Tierkohleadsorption seine volle Wirkung. Wir besitzen für diese Erscheinung keine Erklärung. Für den verschiedenen Monosaccharid-Gehalt des fertigen Extraktes machen wir die Säurekonzentration, welche während des Eindickens des WKE vorhanden ist, verantwortlich. Der WK und der WKE besitzen dieselbe Konzentration an Wirkstoffen. Um mit Sicherheit von einem Wirkstoff sprechen zu können, ist es notwendig, den WKE möglichst zu reinigen. Mit dem WKE erzielten wir keine Förderung der Sporenkeimung von *Phycomyces*. Wir nehmen an, daß die Spore genügend Wirkstoff zur Keimung enthält, aber zu wenig für ihr weiteres Wachstum. Die Zygoten-Bildungsschwelle liegt unter den geprüften Bedingungen bei 1 ccm des WKE I. 1 : 100. Die Glucose-Konzentration (1 %) unserer Nährlösung stellt für *Phycomyces* ein Optimum dar. Zwischen 1 und 10 % ist die Glucose-Menge ohne Einfluß auf das Pilzgewicht. Auf Asparagin ist der Pilz etwa 10mal empfindlicher. Dieses Amid ist in unserer Nährlösung nicht in optimaler Konzentration enthalten. Zwischen 2 und 4 ‰ Asparagin besteht fast kein Unterschied in der Myzelproduktion. Durch eine Zuckerfällung können wir den WKE reinigen. Während der Wirkstoffgehalt auf $^1/_1$ seines Anfangswertes sinkt, vermindert sich der Trockenrückstand des Extraktes um das Elffache. Der 4000. Teil dieses Rückstandes dürfte als Aneurin angesprochen werden (dabei wird der Faktor MP auch in Aneurin ausgedrückt). Innerhalb der Grenze pH 4 und pH 7,6 wächst *Phycomyces* normal, — besonders gut zwischen pH 5,8 und 6,6 —. Im sauren Bereich des Puffers setzt das Wachstum bei pH 4 sprunghaft ein; gegen den alkalischen sinkt es langsam ab. Der ökonomische Koeffizient wurde für *Phycomyces* am 7. Tage als Konstante zu 0.36 bestimmt. Der Wirkstoffgehalt des WKE wird weder durch eine Ultrafiltration, noch durch eine Ultraviolett-Bestrahlung verändert.

III. Der Weizenkeim-Extrakt in seiner Wirkung auf Rhizopus

A. Einleitung

Die *Rhizopus*-Arten, welche wir im folgenden als Testobjekte verwenden werden, unterscheiden sich im Wirkstoffbedürfnis vollständig von *Phycomyces*.

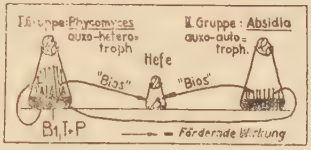
Burgeff 1934 (6) hatte einen Zusammenhang gefunden zwischen Avitaminose und Parasitismus in dem Sinne, daß die Parasiten auxoheterotroph gewordene Pilze seien, welche die Fähigkeit der eigenen Wirkstoff-Synthese verloren haben und als Parasiten vom Wirkstoff des Wirtes abhängig sind.

Schopfer 1935 (43) untersucht, ob sich die Annahme von Burgeff bestätigen lasse. Er findet dabei, daß die Parasiten im engern Sinne des Wortes wirkstoffbedürftig sind, daß diese Erscheinung aber kein spezifisches Merkmal ist, da auch nicht parasitische Arten dieselbe Eigenschaft besitzen. Diejenigen *Mucorineen*, welche sich ohne dem Milieu zugeführte Wirkstoffe entwickeln, könnten dies nicht etwa deshalb, weil sie keine derartigen Substanzen benötigen, sondern weil sie die Fähigkeit besitzen, sie selber aufzubauen. Sie sind auxo-autotroph. Die wichtigste Stütze für diese Annahme ist die Beobachtung, daß Extrakte aus auxo-autotrophen *Mucorineen* das Wachstum von auxoheterotrophen auslösen.

Am besten geklärt sind die Verhältnisse bei *Phycomyces*. Er ist auxo-heterotroph. Mit Aneurin, den Bausteinen (Pyrimidin + Thiazol) dieses Moleküls (Schopfer 1937 [50]), den Extrakten aus seinem Myzel oder den Sporen, oder mit Extrakten aus *Mucorineen* der II. Gruppe kann er zu sehr schönem Wachstum angeregt werden. *Phycomyces* bildet während seines Wachstums Bios. Sein Myzelextrakt aktiviert Pilze seiner Gruppe. Die *Mucorineen* der II. Gruppe sind auxo-autotroph und gedeihen ohne Schwierigkeiten auf unserer Nährlösung. Extrakte aus ihrem Myzel aktivieren *Phycomyces* und *Saccharomyces cerevisiæ*. Man

kann annehmen, daß die Wirkung der Pilzextrakte der II. Gruppe z. T. auf Aneurin zurück zu führen ist.

Wir fassen die beobachteten Tatsachen in folgender Skizze zusammen:



1. Das Vitamin B 1 und seine Komponenten

Die Hypothese, daß eine Mehrzahl von Wirkstoffen im WKE vorhanden sei, fußt auf folgenden wohlbekannten Tatsachen: *Phycomyces* wächst in synthetischer Nährlösung, wenn eine Spur Aneurin oder WKE dem inaktiven Milieu zugeführt wird. Andere *Mucorineen* (auxo-autotrophe), welche der Gattung *Rhizopus* angehören, reagieren negativ auf eine Zugabe von Aneurin. Eine geringe Menge hemmt das Wachstum so stark, daß der Pilz nur ungefähr 50% seines Trockengewichtes erreicht. Der WKE hingegen besitzt eine positive Wirkung auf die Entwicklung derselben *Mucorineen*. Dieses verschiedene Verhalten der Pilzgruppe hat Schopfer 1935 (43) zu der Annahme eines zweiten Wirkstoffes im WKE geführt, dem die Bezeichnung M gegeben wurde.

Wir werden zeigen, auf welche Art es möglich ist, die oben beschriebenen Wirkstoff-Gruppen in verschiedene Kategorien einzuteilen.

Nachdem demonstriert worden ist, daß die fördernde Wirkung des Aneurins auch durch seine Bausteine (P + T) erzielt werden kann, wird es von großem Interesse sein, das Verhalten der durch Aneurin gehemmten *Rhizopus*-Arten in dieser Hinsicht zu prüfen.

In mehreren Versuchen sind die Resultate der Figur 10 bestätigt worden. Die Bausteine des Aneurin-Moleküls: P = 2-Methyl-4amino-5-aminomethyl-pyrimidin und T = 4-Methyl-5-β-hydroxyäthyl-thiazol besitzen, wenn sie gleichzeitig und in Mengen, welche dem Aneurin-Molekül entsprechen, angewendet werden, dieselbe Wirkung wie dieses selbst. Wir müssen die hier beobachtete Wirkung des Aneurin-Moleküls letzten Endes auch seinen Komponenten zuschreiben.

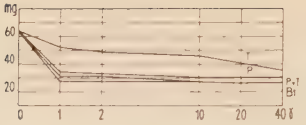


Fig. 10. Einfluß der Bausteine des Aneurin-Moleküls auf das Wachstum von *Rhizopus oryzæ*.
B 1 = Aneurin, T = Thiazol, P = Pyrimidin, P + T = beide Komponenten zusammen.

Das Pyrimidinderivat hemmt das Pilzwachstum stärker als das Thiazolderivat. Wie Versuche mit weiteren *Rhizopus*-Arten, *R. chinensis* und *R. maydis*, gezeigt haben, lassen sich die beobachteten Wirkungen verallgemeinern, ohne daß man aber sagen könnte, wie die Wachstumshemmung zustande kommt.

B. Einfluß der Glucosekonzentration

Wir haben die optimale Zuckerkonzentration für *Rhizopus oryzæ* festgestellt, weil wir diesen Pilz am häufigsten als Test verwendet haben. Die Nährlösung besaß mit Ausnahme der Glucose die übliche Zusammensetzung. *Rhizopus oryzæ* entwickelt sich ohne zugeführten Wirkstoff.

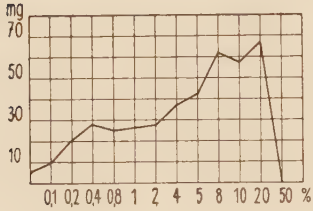


Fig. 11. Abhängigkeit des Wachstums von *Rhizopus oryzæ* von der Glucosekonzentration.
Abszisse: Glucosekonzentration in Prozenten.
Ordinate: Myzelgewicht in mg.

Unsere gewöhnliche Nährlösung enthält 5 % Glucose. Aus Figur 11 geht hervor, daß diese Menge bei *Rhizopus oryzæ* unter gewöhnlichen Kulturbedingungen kein optimales Pilztrockengewicht ermöglicht. 0,4 % und 2 % Glucose bedingen ungefähr gleiches Wachstum. Die optimale Zuckerkonzentration befindet sich ungefähr bei 8 % Glucose. 20 % erweisen sich ebenfalls noch als sehr günstig. Mit 50 % Glucose findet keine Entwicklung mehr statt. Ein Vergleich mit den entsprechenden Verhältnissen bei *Phycomyces* drängt sich uns auf. Dort haben wir die Glucosewirkung zwischen 0 und 10 % untersucht und beobachteten ein steigendes Myzelgewicht bis 1 % Glucose. Eine weitere Konzentrationszunahme fand im Pilzgewicht keinen Ausdruck. Ganz andere Resultate finden wir bei *Rhizopus oryzæ*. Was sich bei *Phycomyces* von 0 bis 1 % Glucose abspielt, geschieht bei *Rhizopus oryzæ* zwischen 1 und 10 %.

C. Der Einfluß der Wasserstoffionen-Konzentration

In diesem Abschnitte prüfen wir das Wachstum von *Rhizopus oryzæ* als Funktion der Wasserstoffionen-Konzentration und des WKE. Als Puffergemisch wählen wir dasjenige von Sörensen: m 5 Na_2HPO_4 und m 10 Citronensäure. Da die Möglichkeit besteht, daß einer dieser Stoffe vom Pilz als Nahrungsquelle verwendet werden könnte, haben wir zuerst die Wahl des Puffers zu rechtfertigen. Endlich bestimmen wir das Wachstum von *Rhizopus oryzæ* als Funktion der Zeit und des optimalen pH. Diese Feststellung ist notwendig, weil das Pilzgewicht für uns das hauptsächlichste und ausschlaggebende Kriterium ist zur Beurteilung des Einflußes der Wirkstoffe.

1. Die Citronensäure (Pufferkomponente)

In diesem Versuche prüfen wir, ob die Citronensäure bei verschiedenen Pilzen als Kohlenstoffquelle dienen kann. Wir verwenden dazu unsere Nährlösung ohne Glucose. Als C-Quelle geben wir die Citronensäure einmal allein, das andere Mal in Form eines Puffers zu. Wir wählen die Puffer mit dem pH4 und pH7:
In der Nährlösung mit dem pH4 ist 1% Citronensäure enthalten
„ „ „ „ „ pH7 „ 0,3% „ „
In der Nährlösung, welche die Citronensäure nicht in der Form eines Puffers enthält, beträgt ihre Konzentration 2,4 bzw. 4,8%. Die Resultate sind in Tabelle 7 vereinigt.

Tabelle 7. Citronensäure als C-Quelle. Myzelgewichte in mg.

Pilze	Gewöhnliche Nährlösung	pH 4 1% Cit.	pH 7 0,3% Cit.	Cit. 2,4%	Cit. 4,8%
R. suinus	49	33	4	22	19
R. oryzæ	73	28	4	14	8
R. nigricans	45	32	6	15	13
R. maydis	22	39	4	8	3

Bei pH4 oder der größten Citronensäurekonzentration der verwendeten Puffer ist das Wachstum gut bis unter dem Mittel, aber in einem Falle *(R. maydis)* besser als das Wachstum der Kontrollen auf normaler Nährlösung. Wenn wir die Myzelgewichte, welche *R. oryzæ* bei diesen Konzentrationen liefert, mit denen der gleichen Glucose-Konzentrationen (Figur 11) ver-

gleichen, dann stellen wir Folgendes fest: Bei pH4 oder 1 % Citronensäure stimmt das Myzelgewicht mit den Werten, die wir mit 1 % Glucose erreichen, überein, bei pH 7 oder 0.3 % Citronensäure, besonders aber bei 2,4 und 4,8 % Citronensäure sind die Myzelgewichte zu klein.

Für uns ist nun von entscheidender Wichtigkeit, ob in gepuffertem Milieu der Pilz die Glucose oder die Citronensäure vorzieht. Zur Abklärung dieser Frage haben wir *Rhizopus oryzæ* und *Rhizopus suinus* in normaler, gepufferter Nährlösung kultiviert und die pH-Werte verfolgt. Tabelle 8 enthält die Ergebnisse.

Tabelle 8: Veränderung der pH-Werte bei gepufferten Nährlösungen während 10 Tagen.

Tage	Gewichte in mg				pH-Werte			
	Contr.	pH3	pH5	pH7	Contr.	pH3	pH5	p7H
	R. suinus							
1.	—	—	—	—	3,9	3,1	5,1	6,9
3.	0	bis	5		3,3	3,1	4,9	6,9
5.	14	24	22	13	3,0	3,1	4,3	6,7
6.	17	38	30	20	u. 3	u. 3	3,9	6,7
7.	18	58	30	24	u. 3	u. 3	3,8	6,4
10.	30	68	39	32	u. 3	u. 3	—	5,2
	R. oryzæ							
3.	10	3	4	3	3,1	3,1	4,9	6,9
5.	24	63	42	19	u. 3	3,0	3,7	6,3
6.	45	83	66	32	u. 3	3,0	3,5	4,6
7.	55	87	58	33	u. 3	3,0	3,3	3,9
10.	70	92	80	64	u. 3	3,0	3,3	6,4

Die pH-Werte sind kolorimetrisch bestimmt worden. Bei der Beurteilung der Tabellenwerte gehen wir von der Annahme aus, das pH nehme zu, d. h. die Azidität nehme ab, wenn die Citronensäure des Puffers vor der Glucose der Nährlösung assimiliert wird. Die Frage ist am leichtesten zu beantworten, wenn der pH-Wert konstant bleibt; doch sind auch hier mehrere Möglichkeiten denkbar. Der wahrscheinlichste Vorgang ist dann, daß die Citronensäure nicht vor der Glucose assimiliert wird und daß die gebildeten Säuren durch den Puffer neutralisiert werden. Nimmt nun aber die Wasserstoffionen-Konzentration von einem bestimmten Zeitpunkt an zu, nachdem sie vorher konstant war, so scheint uns die wahrscheinlichste Deutung die, daß die Pufferwirkung erschöpft

ist. Auch hier kann man den Einwand anbringen, von einem bestimmten Zeitpunkte an könnten sich die Verhältnisse ändern, die Citronensäure würde angegriffen, dadurch das Pufferverhältnis zerstört und durch größere Säureproduktion des Pilzes würde trotzdem die Azidität erhöht.

Wie wir uns die Verhältnisse zu denken haben, wird uns klarer, wenn wir die pH-Veränderung der ungepufferten Kontrolle verfolgen. Wir sehen z. B. bei *Rhizopus oryzæ* wie der Wert in zwei Tagen — von der Impfung weg gezählt — von pH 3,9 auf pH 3,1 sinkt, dabei hat der Pilz nur 10 mg Trockengewicht gebildet. Wenn der Pilz mit zunehmender Größe im gleichen Masse Säure bildet, so ist es nicht erstaunlich, daß die Pufferung ihre zeitliche Grenze hat. Bei *Rhizopus oryzæ* sehen wir, daß im gepufferten Milieu nach zwei Tagen der pH-Wert noch gleich ist, nach vier Tagen ist er bei pH 3, also in der Nähe seines optimalen pH, noch konstant. Wir halten an unserer Deutung fest, daß die pH-Verschiebung sehr wahrscheinlich der starken Säureproduktion zuzuschreiben ist. Wir stützen uns besonders darauf, daß die Pufferung mehrere Tage fast konstant bleibt. Aehnliche Verhältnisse sehen wir in der Tabelle von *Rhizopus suinus*. Gestützt auf diesen Versuch verwenden wir den geprüften Puffer für unsere Kulturen.

Ueber die Mannigfaltigkeit der Verhältnisse, welche man bei dieser Säurefrage zu berücksichtigen hat, geben unter anderen Bernhauer und Thole 1936 (4) Aufschluß. Verschiedene Stämme von *Rhizopus nigricans* bilden, wenn sie auf Glucose wachsen, Fumar, Aepfel- und Milchsäure.

2. Eigentliche Pufferungsversuche

Um eine möglichst brauchbare Pufferung zu erzielen, verwendeten wir die Nährlösung in 5facher Konzentration. Zu 5 ccm dieser Lösung fügten wir 20 ccm des Puffergemisches. Die Pufferlösungen wurden getrennt sterilisiert und wie die Nährlösung 15 Minuten bei 115° gehalten. Nach dem Autoklavieren wurden die Pufferlösungen mit den Nährlösungen vereinigt und diese geimpft. In den zu besprechenden Versuchen ist der Wirkstoff (WKE) in optimaler Menge der Nährlösung beigegeben worden. (2 ccm des 25mal verdünnten Sirups, nachdem Vorversuche gezeigt hatten, daß bei den *Rhizopus*-Arten mit dem Weizenkeim-

Extrakt in der Verdünnung $^1/_{100}$ keine abschließenden Resultate erzielt werden können). Für die Pilze *Rhizopus oryzæ* und *Rhizopus suinus* ist das Wachstum als Funktion der Wasserstoffionen-Konzentration in den Figuren 11 und 12 graphisch dargestellt.

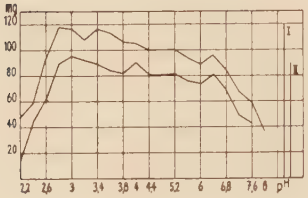


Fig. 12. Wachstum von *Rhizopus oryzæ* als Funktion des pH. I = Nährlösung (NL) + WKE. II = NL, obere Kurve = NL gepuffert + WKE, untere Kurve NL gepuffert, allein.
Abszisse: pH-Werte.
Ordinate: Myzelgewicht in mg.

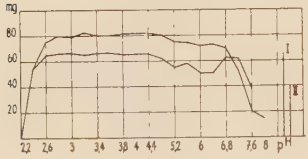


Fig. 13. Wachstum von *Rhizopus suinus* als Funktion des pH. Bezeichnungen wie in Fig. 12.

Die Versuche enthielten als Kontrollen Kolben mit Nährlösung allein und solche mit der optimalen WKE-Menge. Für beide *Rhizopus*-Arten sehen wir vorerst eine deutliche Trockengewichtszunahme in den Erlenmeyern mit WKE gegenüber denjenigen mit reiner Nährlösung. Die Zunahme beträgt 25—30 mg. Für *Rhizopus suinus* läßt sich folgern, daß die Nährlösung, gemessen an der Kontrolle, nicht eine optimale Wasserstoffionen-Konzentration besitzt. Die Trockengewichte der gepufferten Nährlösung übersteigen diejenigen der gewöhnlichen, im für den Pilz günstigsten Bereich des pH.

Bei *Rhizopus oryzæ* hingegen muß der pH-Wert der Nährlösung dem optimalen entsprechen, da die ungepufferte Nährlösung dieselben Gewichte ermöglicht wie die gepufferte. Im weiteren zeigen die verwendeten *Rhizopus*-Arten auch Aehnlichkeiten. Bei beiden verlaufen die Kurven: NL + WKE und NL fast parallel; ebenso überlagert die Wirkstoffkurve diejenige ohne WKE. Aus den Versuchsdaten läßt sich folgern, daß unter den angeführten Bedingungen eine Pufferung der NL keinen begünstigenden Einfluß auf das Wachstum von *Rhizopus oryzæ* ausübt, im Gegensatz zu *Rhizopus suinus*.

Als allgemeines Ergebnis aus beiden Versuchen ersehen wir den pH-Bereich, innerhalb welchem das Wachstum dieser Pilze mög-

lich ist. Er ist für beide *Rhizopus*-Arten durch steile Anstiege der Gewichtskurven im günstigen pH von den übrigen pH-Werten abgegrenzt. Für *Rhizopus suinus* setzt das optimale Wachstum bei pH 2.8 ein und hält an bis pH 4,8, um bei pH 6,8 seine Wachstumsgrenze zu erreichen. Das optimale Wachstum von *Rhizopus oryzæ* setzt ebenfalls bei pH 2.8 ein, ist aber nur möglich bis pH 3.6. Der Pilz wird in seiner Entwicklung von pH 6,8 an aufwärts stark gehemmt.

Das optimale pH wird nun im nächsten Versuch verwendet. Beide *Mucorineen* lieferten dieselben Resultate. Hier beschreiben wir den am meisten gebrauchten Pilz, *Rhizopus oryzæ*. Die Konstanten des Versuches sind das pH (pH 3) und die Wirkstoffmenge (2 ccm WKE $^1/_{25}$). Wir setzen folgende Versuchsreihen an:

a. Nährlösung
b. „ gepuffert
c. „ gepuffert + WKE.
d. „ + WKE.

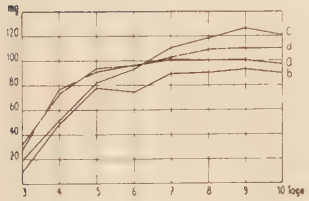


Fig. 14. Wachstum von *Rhizopus oryzæ* als Funktion der Zeit. a, b, c, d, wie im Text beschrieben.

Bünning 1934 (7) verfolgt in einem Milieu, das Ammonium-Nitrat als N-Quelle enthält, die pH-Veränderungen unter dem Einfluß eines Wirkstoffes. Der von ihm verwendete B-Wirkstoff fördert bei *Aspergillus niger* die Aufnahme des Nitrat-Stickstoffes und hemmt die des Ammonium-Stickstoffes. Infolgedessen tritt eine schnelle Zunahme des pH-Wertes ein.

Nach Nielsen 1931 (26) übt eine Rhizopinlösung (eine gebrauchte Nährlösung von *Rhizopus suinus)* einen starken wachstumsfördernden Einfluß aus auf *Aspergillus niger*. Schon nach zwei Tagen erreicht der Pilz das Maximum an Trockengewicht, ohne Wirkstoff aber erst nach ca. sechs Tagen. Unter dem Einfluß des Wirkstoffes nimmt aber das maximale Gewicht sofort wieder ab (Autolyse!). Darin unterscheidet sich *Aspergillus niger* — Nielsen und Hartelius 1933 (25) — ganz von unseren *Rhizopus*-Arten. Ohne Wirkstoffzusatz befindet sich das optimale pH etwas unterhalb pH 3, mit Wirkstoff zwischen pH 6—7. Das

ist ebenfalls eine Erscheinung, die wir in unseren Versuchen nicht feststellten.

Im Gegensatz zu den Versuchen mit *Phycomyces* verfügt man bei denjenigen mit *Rhizopus*-Arten noch nicht über dieselbe Sicherheit, in Parallelserien und mit gleichen WKE-Mengen, dasselbe Pilztrockengewicht zu erzielen. In der Regel weichen auch die Resultate, welche mit WKE in der Verdünnung 1 : 25 erzielt werden, nicht wesentlich von einander ab. Hie und da treten aber unmögliche Schwankungen der Pilzgewichte auf, die ohne Parallelreihen eine Wiederholung des betreffenden Versuches notwendig machen würden. Diese Bemerkung gilt ganz besonders für den WKE in der Verdünnung 1 : 100. Hier erhält man selten eine Serie eindeutiger Werte. Wie Versuche mit konstanter und variabler Sporenimpfmenge zeigten, ist diese ohne Einfluß auf die Gewichte. Eine Unbekannte, die in ihrer Wirkung bis jetzt nicht abgewogen werden konnte, stellt der gesamte Zustand des Impfstammes dar. (Alter, Zahl seiner Ueberimpfungen . . .)

Bei *Phycomyces* drückt sich die Wirkstoffmenge in der Dichte und Höhe des Luftmyzels aus. Die einzelnen Sporangienträger erreichen den Wattestöpsel des Erlenmeyers (150 ccm). Einen ganz anderen Habitus besitzen die *Rhizopus*-Arten. In unseren Kulturen haben sie maximal 1.5 cm Luftmyzel *(R. oryzæ)*. Ein viel niedrigeres Myzel erreichen *R. maydis* und *R. chinensis* (ca. 5 mm). Ein Ablesen der Wachstumsunterschiede in der Höhe des Myzels ist bei *Rhizopus* praktisch unmöglich. Deutlich erkennbar sind immer die Kontrollen bei *R. maydis* und *R. chinensis*. Die beiden Pilze bilden in der Nährlösung nur untergetauchtes Myzel.

D. Die Faktorentrennung mit Tierkohle B1, MP, MR, Bios

Die Tatsache (43), daß im WKE eine Mehrzahl von Wirkstoffen enthalten ist, fußt auf folgenden Beobachtungen: *Phycomyces* kommt in einer synthetischen Nährlösung erst zum Wachsen, wenn ihr eine Spur Aneurin oder WKE zugeführt wird. Verschiedene *Rhizopus*-Arten, die in synthetischer Nährlösung ohne Wirkstoff gedeihen, werden schon bei Zugabe einer kleinen Menge Aneurin in ihrer Entwicklung stark gehemmt. Der WKE dagegen fördert die Trockensubstanzbildung dieser *Mucorineen*.

Diese Tatsachen führten zur Annahme von mindestens zwei Wirkstoffen im WKE. Der eine ist Aneurin, der zweite wird von Schopfer 1935 (43) Faktor M genannt. Dieser ist bis heute einzig durch die biologische Methode nachgewiesen. Er greift auch in den Stoffwechsel der *Rhizopus*-Arten ein.

Die Beeinflussung der *Rhizopus*-Arten durch Wirkstoffe erinnert an eine ähnliche Erscheinung bei *Aspergillus niger*. Das Wachstum des genannten Pilzes wird durch die B-Substanzen von Nielsen stark beschleunigt und gefördert.

Bevor wir an die Faktorentrennung gehen, haben wir zu entscheiden, ob die beobachtete Wirkung einer organischen oder mineralischen Substanz zukommt. Zur Beantwortung dieser Frage veraschen wir den WKE.

1. Die Asche des Weizenkeimextraktes

Wir geben 3 ccm konzentrierten WKE IV in einen Platintiegel. Im Thermostaten lassen wir den Extrakt sieben Stunden bei 105°, um das im Sirup enthaltene Wasser abzudunsten. Hierauf veraschen wir in kleiner Bunsenflamme und offenem Tiegel. Die entweichenden Gase blähen den Extrakt auf. Wenn die Masse ruhig bleibt, setzen wir den Deckel auf den Tiegel und glühen so lange, bis alle Aschenteile weiß erscheinen. Bei dieser Behandlung bleiben natürlich nur Substanzen im Tiegel zurück, die in dieser Hitze nicht zerlegt werden und nicht flüchtig sind. Die Zahl dieser Verbindungen im Keime ist nicht groß. Beim Aufnehmen der Glührückstände mit 5 ccm HCl zeigt das Brausen an, daß es sich in der Hauptsache um Karbonate handeln muß. Mit bloßem Auge sind nach der Säurebehandlung keine ungelösten Rückstände zu beobachten. Die Salzsäurelösung wird mit der entsprechenden Menge NaOH neutralisiert und auf die Verdünnung 1 : 25 gebracht. In Figur 15 sind die Ergebnisse, welche mit der Asche des WKE erhalten worden sind, dargestellt.

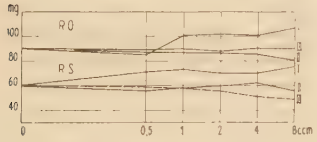


Fig. 15. Einfluß des veraschten WKE auf das Wachstum von *Rhizopus oryzæ* (R. O.) und *Rhizopus suinus* (R. S.) I = WKE, II = Asche, III = NaOH + HCl, der Neutralisation entsprechend, verdünnt.

Wie aus Figur 15 hervorgeht, übt die Asche des WKE keine Wirkung mehr aus. Sehr wahrscheinlich ist also der Wirkstoff organischer Natur.

Bevor wir an die eigentliche Trennung der Wirkstoffe gehen, haben wir noch die Rolle des Stickstoffes zu besprechen. Es wäre sehr wohl möglich, daß das zusätzliche Myzelgewicht durch eine im Weizenkeime enthaltene Stickstoffverbindung hervorgerufen würde. Für *Rhizopus maydis* und *Rhizopus chinensis* ergibt sich (47), daß eine Asparaginlösung, welche gleich viel N enthält wie ein verdünnter WKE, die Wachstumsförderung nicht ermöglicht. Zwei weitere *Rhizopus*-Arten, *R. tonkinensis* und *R. oryzæ*, sind untersucht worden gegenüber den beiden Aminen, Hordenin und Tyramin, welche nach Yoschimura 1911 (55) im WK enthalten sind. Auf die beiden angeführten Pilze sind sie in den angewendeten Konzentrationen ohne Einfluß. Die verwendeten Lösungen dieser Verbindungen entsprechen im N-Gehalt dem WKE in der Verdünnung 1 : 100.

Da *Rhizopus suinus* und *Rhizopus oryzæ* ein größeres Myzelgewicht bilden, da sie ferner ein höheres Luftmyzel besitzen und weil sie sich gegenüber dem Aneurin und dem WKE gleich verhalten wie *Rhizopus maydis* und *Rhizopus chinensis*, wählten wir sie für unsere Versuche. Die ersten Untersuchungen galten der Frage, ob der Faktor M durch eine Hitze- oder H_2O_2-Behandlung verändert werden könne. Wir wendeten die Wirkstofflösungen in der Verdünnung 1 : 100 an, erzielten aber weder mit dem WKE noch mit den behandelten Extrakten eine Förderung oder Hemmung des Pilzwachstums.

Da der einzelne Pilz nicht immer in gleicher Weise reagiert, (die Impfstämme sind nie gleichen Alters) nahmen wir an, sie könnten sich in einem Zustand erhöhten Wirkstoffbedürfnisses befinden. Daher verabreichten wir von diesem Zeitpunkte an die WKE viermal konzentrierter, in der Verdünnung 1 : 25. Mit diesen Mengen WKE erzielten wir nun eindeutigere Resultate.

2. Die Tierkohleadsorption im Weizenkeimextrakt

Der Faktor MR

Bekanntlich wird das Vitamin B 1 von Tierkohle adsorbiert. Wir haben diese Eigenschaft verwendet. Wir nahmen uns vor, den WKE von seinem Aneurin zu befreien und zu prüfen, wie sich das Filtrat gegenüber *Phycomyces* und den *Rhizopus*-Arten verhalte; denn es bestand eine gewisse Wahrscheinlichkeit dafür, daß der zweite, auf *Rhizopus* aktive Faktor, durch Tierkohle nicht

adsorbiert würde. Der WKE wurde folgendermaßen behandelt:

1. Der WKE wird mit destilliertem Wasser 10mal verdünnt.
2. Die Tierkohle wird der Lösung zugegeben. Das Ganze bleibt eine Stunde in Kontakt und wird von Zeit zu Zeit geschüttelt.
3. Die Suspension wird filtriert.
4. Das Filtrat wird auf die Verdünnung 1 : 25 gebracht.

Es ist uns mit Tierkohle (Carbo animalis siccus, Merck) gelungen, die Wirkstoffe, welche das Wachstum von *Phycomyces* auslösen, vollständig aus dem WKE zu entfernen. Die Substanzen, welche die *Rhizopus*-Arten zu vermehrter Myzelbildung anregen, bleiben dagegen, wie Figur 16 zeigt, im Filtrat zurück.

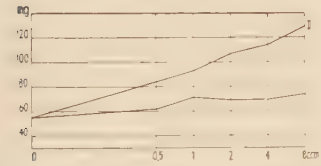


Fig. 16. Wachstum von *Rhizopus oryzæ* unter dem Einflusse des WKE (I) und des WKE nach Tierkohle-Adsorption (II).

Zu dem hier verwendeten WKE IV ist folgende Bemerkung zu machen: Wie später mit anderen WKE ausgeführte Versuche zeigten, bedeutet die schwache Wirksamkeit des WKE IV, ebenso wie die sehr stark positive des Extraktes nach Tierkohle-Adsorption, eine Ausnahme. In den meisten Versuchen decken sich sonst die Wirkungen der Extrakte vor und nach dieser Behandlung. Da wir mit dem IV. WKE erstmals die Trennung der Faktoren vornahmen, konnten wir diesen Gegensatz nicht kennen. Wir haben demnach auch keine Versuche ausgeführt, die zur Erklärung dieser Erscheinung beitragen könnten.

Durch dieses Experiment wird also bestätigt, was wir in Bezug auf *Phycomyces* schon kennen: Der mit Tierkohle behandelte WKE verliert seine Wirkung auf *Phycomyces* und zwar sehr wahrscheinlich infolge Adsorbtion des Aneurins und eventuell weiterer Faktoren. Neu dagegen ist die Tatsache, daß die Wirkung auf die *Rhizopus*-Arten nicht aufgehoben wird. Der entfärbte Extrakt behält seine volle Wirksamkeit gegenüber dem Pilz.

Die erste Definition war einzig gegründet auf das verschiedene Verhalten von *Phycomyces* und *Rhizopus*-Arten dem WKE und Aneurin gegenüber. Hier haben wir den Beweis erbracht, daß tatsächlich zwei Faktoren oder Faktorengruppen bestehen. Sie sind getrennt und unterscheiden sich, wie wir noch näher aus-

führen werden, in einigen Eigenschaften. Unter unseren Versuchsbedingungen scheint dieser Faktor mindestens ebenso thermostabil zu sein wie das Vitamin B 1. Auf Grund dieser Tatsache allein kann keine Hypothese aufgestellt werden über die Natur des Faktors. Die Möglichkeit ist nicht ausgeschlossen, daß es sich dabei um eine einfache und bekannte Substanz handelt.

Die Wirkung des WKE IV auf *Rhizopus oryzæ* erscheint demnach als Resultante: positive Wirkung eines Faktors, (wir nennen ihn MR), negativer Einfluß des Aneurins. Nach der Entfernung des Aneurins durch die Tierkohle äußert sich einzig der Faktor MR in seiner ganzen Stärke.

Daß es sich bei der Tierkohlebehandlung tatsächlich um eine Adsorption des Aneurins handelt, konnte (47) gezeigt werden. Es gelang, die adsorbierte Substanz zu eluieren. Sie zeigte erneut die fördernde Wirkung auf *Phycomyces* und die hemmende auf *Rhizopus*.

Tabelle 9. Die im WKE getrennten Wirkstoffe und ihr Einfluß auf das Wachstum von *Phycomyces* und *Rhizopus*.

WKE	+	Wirkung auf *Phycomyces*
	+	„ „ *Rhizopus*
Filtrat der Tierkohleadsorption	0	„ „ *Phycomyces*
	+	„ „ *Rhizopus*
Elution aus Tierkohle	+	„ „ *Phycomyces*
	—	„ „ *Rhizopus*

Als neue Tatsache geht aus diesen Versuchen hervor, daß im WKE ein auxogener Faktor existiert, der nur auf *Rhizopus* wirkt und *Phycomyces* unbeeinflußt läßt. In einer ersten Arbeit, die den Anlaß zu diesen Untersuchungen gab, nennt Schopfer 1935 (43) den Faktor, welcher auf *Rhizopus* und möglicherweise auf *Phycomyces* wirkt, Faktor M. Da wir aber einen zweiten auf *Phycomyces* aktiven, thermostabilen Faktor anzunehmen gezwungen sind, gilt es, die beiden Gruppen auch formell zu trennen. Um eine klare Linie einzuhalten, führen wir den Buchstaben M weiter, charakterisieren ihn aber durch einen zweiten, der die Pilzgattung bezeichnet, also: Faktor MR und Faktor MP (R = *Rhizopus*, P = *Phycomyces*).

3. Die asparagin-empfindlichen Mucorineen

a) Die Stickstoffwirkung des WK -Extraktes.

Wir haben erwähnt, wie sich einige *Mucorineen* verschiedenen N-Quellen gegenüber verhalten. In den Versuchen mit *Phycomyces* verwenden wir die WKE in der Verdünnung 1 : 100, dort ist die Wahrscheinlichkeit kleiner, daß die Wirkung einer plastischen Substanz zugeschrieben werden muß. In den Versuchen mit *Rhizopus* wird der WKE viermal konzentrierter verwendet. Hier ist die mit dem Extrakt zugeführte Menge Trockensubstanz so groß, daß wir uns sofort fragen müssen, ob das zusätzliche Wachstum einem Wirkstoff zugeschrieben werden darf. Wenn wir die im WKE bestimmte N-Menge berücksichtigen, dann scheint uns nicht ausgeschlossen, daß ihr das zusätzliche Wachstum zu verdanken ist. Den Anstoß zur gründlichen Ueberprüfung der Stickstoff-Verhältnisse gab der nächste Versuch. Wir nahmen uns vor, das Wachstum von *Rhizopus oryzæ* bei verschiedenen Asparagin-Konzentrationen als Funktion einer steigenden Menge WKE zu verfolgen. In parallel angesetzten Versuchsreihen variierten wir in der Nährlösung den Asparagingehalt von 0 bis 4 $^0/_{00}$. In jeder Reihe stieg die WKE-Menge von $^5/_{100}$ bis 4 ccm.

Aus Figur 17 ergibt sich vorerst einzig die Abhängigkeit des Wachstums vom Asparagin. Vergleichen wir diese Versuchsreihen mit den entsprechenden von *Phycomyces*, so sehen wir dort, daß dieser mit Asparagin allein nicht zum Wachsen gebracht werden kann. *Rhizopus* hingegen ändert mit der Stickstoffmenge sein Anfangsgewicht. Das Wachstum beginnt bei $^1/_{10}$ $^0/_{00}$ Asparagin oder 0,02 $^0/_{00}$ N. Bei dieser Asparagin-Konzentration bildet *Rhizopus oryzæ* 10 mg getrocknetes Myzel, bei einer solchen von $^5/_{10}$ $^0/_{00}$ erreicht er das vierfache Gewicht. Verdoppelt man nun die N-Zugabe, so erhält man bei *Rhizopus*, im Gegensatz zu *Phycomyces*, fast gleichviel Myzel. Bei einer Betrachtung der N-Wirkung nur in diesem Bereiche allein könnte man die Behauptung aufstellen, *Rhizopus oryzæ* sei unempfindlich gegenüber Asparagin. Oberhalb 1 $^0/_{00}$ Asparagin stellen wir erneut einen prinzipiellen Unterschied zwischen den verglichenen Gattungen fest. *Phycomyces* wird für das genannte Amid fast unsensibel. Wenn die Stickstoffmenge von 1 auf 2 $^0/_{00}$ steigt, dann findet noch eine Gewichtszunahme von 15 mg statt, von 2 auf 4 $^0/_{00}$ keine. (Nach

unserer Auffassung dürfte diese Erscheinung mit Wirkstoffmangel zu erklären sein). Zu gleicher Zeit wachsen die Anfangsgewichte (ohne WKE-Zusatz) von *Rhizopus oryzæ* sprunghaft an und zwar so, daß die Gewichte der Asparaginkonzentration direkt proportional sind: 45, 80, 150 mg. Soweit bietet der Versuch keine Ueberraschungen und man könnte die Betrachtungen mit dieser Gegenüberstellung abschließen. Vielleicht könnte man noch hinzufügen, daß durch den WKE das Pilztrockengewicht im allgemeinen um 30—40 mg erhöht wird.

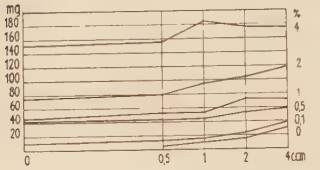


Fig. 17. Wachstum von *Rhizopus oryzæ* als Funktion der Asparagin-Konzentration und steigenden WKE-Mengen.
Abszisse: WKE 1 : 25 in ccm.
Ordinate: Myzelgewicht in mg.
Rechts: Asparagin in ‰ (nicht %).

Nun muß aber bei einer genaueren Betrachtung der Kurven, welche man mit 0 und $^1/_{10}$ ‰ Asparagin erhält, die deutliche Parallelität zwischen beiden auffallen. Noch einmal könnte man diese Erscheinung dem Wirkstoff zuschreiben, hätte sich der Pilz nicht so N-empfindlich gezeigt. Man muß also gleichzeitig postulieren, diese Wirkung werde durch dem Milieu zugeführten N bedingt, möglicherweise durch im WKE enthaltenes Asparagin. Ueber Asparaginvorkommen im Weizenkeim berichten Frankfurt 1896 (11) und Stieger 1913 (52).

b) Ersetzung des Faktors „MR" durch Asparagin

Wir gingen nun zum direkten Asparagin-Vergleich über. Wir wählten den WKE in seiner aktivsten Form, d. h. nach Tierkohleadsorption. Dem Versuch liegt folgende Rechnung zugrunde:

Der konzentrierte WKE enthält 1,2 % Stickstoff.
Der 25mal verdünnte WKE enthält 0,048 % Stickstoff.
100 ccm WKE $^1/_{25}$ enthalten 48 mg.
Die gleiche Menge N ist in 250 mg Asparagin enthalten.
Dieses Gewicht lösen wir in 100 ccm Wasser.

Zu unserer Nährlösung gaben wir in einer Versuchsreihe steigende Mengen des WKE 1 : 25 nach Tierkohle-Adsorption, zu der andern gleiche Volumen einer Asparaginlösung mit gleichviel N. Der Versuch zeigt mit aller Deutlichkeit und es wurde mehrmals bestätigt, daß mit einer in Stickstoff äquivalenten Aspara-

ginlösung dieselbe Trockengewichtskurve erzeugt werden kann wie mit dem WKE. Für den Moment ruft diese Feststellung zwei Fragen: sind die Resultate mit den Mucorineen, *Rhizopus chinensis* und *Rhizopus maydis* ein Zufall, oder sind die Pilze unempfindlich auf Asparagin? Wir werden diese Fragen in einem der nächsten Versuche prüfen.

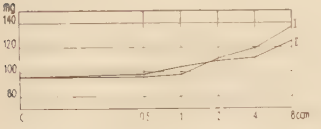


Fig. 18. *Rhizopus oryzæ:* Ersatz des „Wirkstoffes" durch Asparagin. I = Asparagin, II = WKE nach Tierkohleadsorption (TK).
Abszisse: WKE nach TK und Asparaginlösung in ccm.
Ordinate: Myzelgewichte in mg.

Wir wissen jetzt, daß *Rhizopus suinus* und *R. oryzæ* sehr empfindlich auf Asparagin sind. Können wir die vom Weizenkeime ausgelöste Wirkung dem Asparagin zuschreiben? Das Vorkommen von Asparagin läßt diese Möglichkeit zu. Es ist nicht ausgeschlossen, daß dieses Amid bei unserer Extraktzubereitung angereichert wird. Unser WKE ist noch nie vom chemischen Standpunkt aus untersucht worden, sodaß es uns nicht möglich ist, einer bestimmten Verbindung die beobachtete Wirkung zuzuschreiben.

c) Enthält das Asparagin einen Wirkstoff?

Trotz der Uebereinstimmung zwischen der WKE- und der Asparaginwirkung mußten wir die Hypothese aufstellen, das Asparagin könnte - ähnlich wie die Maltose Kahlbaum — eine Verunreinigung auxogenen Charakters enthalten. Diese Annahme ist nicht von vornherein von der Hand zu weisen; denn bekanntlich wird das Asparagin hauptsächlich aus Pflanzen isoliert. Der Abklärung dieser Frage gilt der nächste Versuch. Wir prüfen zwei Asparaginfabrikate; dem Experiment liegt folgende Anordnung zugrunde:

1. WKE V $^1/_{25}$
2. WKE V $^1/_{25}$ nach Tierkohleadsorption
3. Asparaginlösung 1,45 % } Hoffmann-La Roche
4. „ 1,2 % } Hoffmann-La Roche
5. „ 1,45 % } Schuchart 1mal umkristallisiert
6. „ 1,45 % } Schuchart 1mal umkristallisiert
7. „ 1,45 % } „ 2mal „

Zur normalen Nährlösung werden 0—8 ccm dieser Lösungen gegeben.

Die Resultate sind in Tabelle 10 zusammengestellt.

Tabelle 10. Wachstum von *Rhizopus oryzæ* unter dem Einfluß verschiedener Asparagin-Proben. Die Ziffern 1—7 beziehen sich auf den Text. Die Myzelgewichte sind in mg angegeben.

Lösungen in ccm	Kontrolle	$^5/_{10}$	1	2	4	8
1.	88	88	80	99	98	127
2.	88	99	100	108	113	123
3.	88	76	72	74	97	106
4.	88	80	74	79	86	85
5.	88	84	87	104	124	160
6.	88	94	97	103	127	165
7.	88	91	98	100	99	118

Gestützt auf diese Ergebnisse ist die Frage einer Verunreinigung zu verneinen. *Rhizopus oryzæ* ist in diesem Versuche sehr unregelmäßig gewachsen. Die Asparagin-Kurve erreicht die des WKE nach Tierkohleadsorption nicht. Beim Vergleichen der Wirkungen der beiden Asparagine kommt man eher beim Fabrikat Schuchardt auf den Gedanken, im nicht umkristallisierten Präparat sei ein wirksamer Faktor enthalten. Für uns ist maßgebend, daß im Asparagin von Hoffmann-La Roche keine aktive Substanz nachgewiesen werden konnte.

In einem letzten Versuche prüfen wir unser Asparagin nochmals auf seine Reinheit. Wir vergleichen zwei Asparagine; das synthetische Produkt (Asparagin-hydrochlorid) dient als Kontrolle. Wenn beide in ihrer Wirkung übereinstimmen, dann ist die Möglichkeit einer auxogenen Verunreinigung endgültig ausgeschlossen. Das Molekulargewicht des Asparaginhydrochlorids berechnet sich zu 186,45. Gleiche N-Mengen sind dann enthalten in 386 mg Asparaginhydrochlorid und 311 mg Asparagin. Diese Substanzen werden in je 100 ccm Wasser gelöst und in steigenden Mengen der Nährlösung beigegeben.

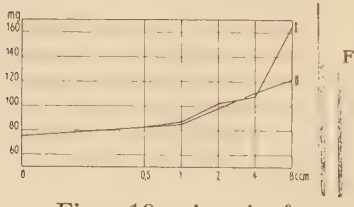


Fig. 19. Vergleich des Wachstums von *Rhizopus oryzæ* unter dem Einfluß von Asparagin (I) und Asparagin-Hydrochlorid (II).

Figur 19 zeigt ein fast vollständiges Uebereinstimmen der beiden Stickstoff-Quellen in ihrer Wirkung auf den Pilz. Die relativ große Abweichung der Gewichte bei 8 ccm Lösung muß sehr

wahrscheinlich mit dem launischen Wachstum des Pilzes erklärt werden. In Parallelserien sind oft Abweichungen von $\pm 20\,\%$ vom Mittelwert feststellbar.

Nachdem nun dieses synthetische Asparagin ein positives Wachstum ergeben hat, muß die Reinheit unserer Asparaginproben angenommen werden. Folglich ist die bei *Rhizopus oryzæ* und *R. suinus* beobachtete Wachstumssteigerung durch den WKE keinem Wirkstoff zuzuschreiben, sondern einer N-Quelle (Asparagin). Durch eine N-haltige Verbindung haben wir unsern postulierten Faktor MR ersetzen können. Es lag daher auf der Hand, zu prüfen, ob die Wirkung des Asparagins eine spezifische sei, oder ob sie durch andere stickstoffhaltige Verbindungen erzeugt werden könne.

d) Andere Stickstoffquellen

Mit folgenden Verbindungen haben wir diese Frage in Angriff genommen:

1. Asparagin	268 mg
2. Ammoniumsulfat	235 mg
3. Harnstoff	107 mg
4. Glykokoll	267 mg
5. Glutaminsäure	521 mg

Diese Mengen enthalten gleichviel Stickstoff und werden in 100 ccm gelöst. Von diesen Lösungen wurden 0 bis 8 ccm der normalen Nährlösung zugesetzt.

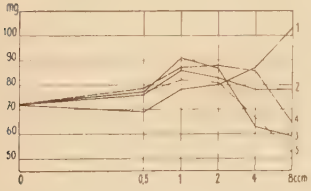


Fig. 20. Wirkung verschiedener Stickstoffverbindungen auf das Wachstum von *Rhizopus oryzæ*.

Mit Asparagin ergibt sich auch hier die charakteristische Gewichtskurve, die wir ebenso von den Versuchen mit WKE kennen. Alle andern Verbindungen wirken günstig auf den Pilz bis zu 1 ccm zugeführter Lösung, wo eine maximale Wirkung zutage tritt. Bei Zugabe größerer N-Mengen sinken die Gewichte ab. Worauf diese Hemmung beruht, wurde bis jetzt nicht untersucht. Für unsere Aufgabe ist die Antwort nicht von primärer Bedeutung. In Frage käme eine toxische Wirkung oder eine nachteilige pH-Veränderung.

In diesem Versuche galt es zu prüfen, ob andere N-Verbindungen dieselbe Wirkung besitzen auf das Wachstum von *Rhizopus oryzæ* wie das Asparagin. Wie Figur 20 zeigt, ist es unmöglich, mit den geprüften Substanzen das erwartete Myzelgewicht zu erhalten. Daraus folgern wir, daß sehr wahrscheinlich auch im WKE das Asparagin die fördernde Wirkung ausübt. Wir sind der Auffassung nicht abgeneigt, daß unter entsprechenden Bedingungen mit allen hier geprüften Substanzen ein besseres Pilzwachstum erzielt werden könnte. Für *Rhizopus oryzæ* und *R. suinus* ist es nach allen ausgeführten Versuchen möglich, den postulierten Faktor MR des WKE durch N-Verbindungen zu ersetzen, am besten gelingt es mit Asparagin (Hoffmann-La Roche).

e) Vergleich allgemeiner Eigenschaften des WKE und des Asparagins

Einen Beweis für die Beeinflussung des Wachstums von *Rhizopus oryzæ* durch Asparagin liefert der folgende Versuch. Er gibt zugleich eine Erklärung für das kleinere Myzelgewicht, welches der Pilz unter dem Einfluß eines mit Tierkohle behandelten WKE bildet.

Wir haben auf das Asparagin dieselben Methoden angewendet wie auf den WKE in den Versuchen zur Faktorentrennung. Es sind dies die Tierkohleadsorption, die Hitzebehandlung und die Oxydation mit H_2O_2. Folgende Lösungen wurden untersucht:

1. Asparaginlösung, 311 mg in 100 ccm Wasser.
2. WKE V 4 ccm „ 100 ccm „
3. Asparaginlösung (1.) nach Tierkohlebehandlung } je 16 g Tierkohle.
4. WKE (2.) „ „ }
5. Lösung (1.) 2 Stunden am Rückflußkühler gekocht.
6. „ (2.) 2 „ „ „ „
7. 311 mg Asparagin + 50 ccm Wasser } Oxydation mit je 20 ccm H_2O_2
8. 4 ccm WKE V + 50 ccm Wasser }

Dauer der Oxydation: 2 Stunden am Rückflußkühler bei Siedetemperatur.

Nach der Oxydation wurden die Lösungen auf dem Wasserbade eingedampft, längere Zeit trocknen gelassen, mit destilliertem Wasser aufgenommen und auf die ursprüngliche Verdünnung gebracht. Die Ergebnisse des Versuches sind in Figur 21 dargestellt. Weder die Asparaginlösung, noch der WKE erleiden während der kräftigen Hitzebehandlung eine Abschwächung ihrer Wirkung. Die Tierkohleadsorption und ebenso die Oxydation entfernen oder zerstören sehr wahrscheinlich — wenn auch nur teilweise — in

den beiden Lösungen die zum Aufbau des zusätzlichen Pilzmyzels benötigte Substanz.

Die Tierkohle adsorbiert aus unserem WKE das Aneurin, den hypothetischen Faktor MP, die Biosstoffe und, wie dieser Versuch wahrscheinlich macht, auch N-Verbindungen. Durch einen direkten Versuch weisen wir nach, daß die Tierkohle auch Asparagin adsorbiert. Wir haben die Behauptung aufgestellt, der verminderten Wirkung des Asparagins auf den Pilz entspreche eine Asparagin-Adsorption. Den Beweis erbringen wir mit folgenden Daten: In einer Asparaginlösung (50 ccm Wasser mit 155 mg Asparagin) führten wir mit 8 g Tierkohle eine Adsorption aus. In einem Kontrollversuch bestimmten wir nach Kjeldahl in 155 mg Asparagin 18.89 % Stickstoff. Drei Bestimmungen nach Tierkohlebehandlung ergaben einen Mittelwert an zurückbleibendem N von 8.96 %. Unter unseren Versuchsbedingungen wird also rund die Hälfte des Asparagins von der Tierkohle adsorbiert.

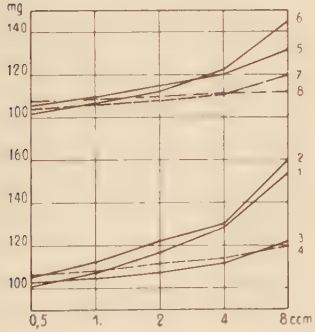


Fig. 21. Wachstum von *Rhizopus oryzæ* unter dem Einflusse der Lösungen 1–8. Seite 42.
Abszisse: Lösungen in ccm.
Ordinate: Myzelgewichte in mg.

Es wäre allerdings noch denkbar, daß die Tierkohle eine andere Eigenschaft besitzt. Verändert sie das pH, enthält sie einen schädlichen Stoff? Um zu prüfen, ob vielleicht mit Wasser hemmende Substanzen entfernt werden, spülten wir 16 g Tierkohle mit 1 Liter heißem, destilliertem Wasser. Auch mit gewaschener Tierkohle läßt sich die Herabsetzung des Wachstums nicht verhindern. Diese Erscheinung können wir jetzt erklären, ohne daß wir genötigt sind, dem Adsorptionsmittel neue Eigenschaften zuzuschreiben.

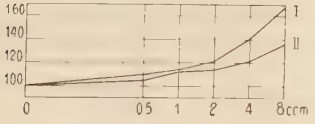


Fig. 22. Wachstum von *Rhizopus oryzæ* als Funktion des WKE.
I = WKE nicht behandelt.
II = „ nach Tierkohleadsorption

Für die beiden *Rhizopus*-Arten, *R. oryzæ* und *R. suinus* ist somit dargetan, daß bei ihnen der postulierte Wirkstoff MR durch Asparagin ersetzt werden kann. Die verwendete Asparaginlösung muß dieselbe N-Menge enthalten wie der geprüfte WKE. Die zur Adsorption verwendete Tierkohlemenge entscheidet darüber, welche Wirkung der WKE auf diese Pilze ausüben kann.

4. Die Trennung der Faktoren MP und MR für Rhizopus chinensis und Rhyzopus maydis

Wir haben gezeigt, daß bei *Rhizopus oryzæ* und bei *R. suinus* der Faktor MR durch eine N-Verbindung ersetzt werden kann, am besten durch Asparagin. Nun kennen wir aber *Mucorineen*, die auf Asparagin nicht zu reagieren scheinen. (Schopfer und Moser 1936 [47]). Es sind dies *R. maydis* und *R. chinensis*. Wir haben sie bis jetzt in unseren Versuchen nicht verwendet, weil *R. oryzæ* und *R. suinus* ein größeres Myzelgewicht liefern.

Wir werden nun mit diesen Pilzen zeigen, daß der Faktor MR existiert. In der soeben angeführten Arbeit ist festgestellt worden, daß Asparagin ihr Wachstum nicht fördert. Die verwendete Asparaginlösung enthielt gleichviel N wie ein WKE in der Verdünnung 1 : 100. In diesem Versuche verwenden wir den WKE in der Konzentration 1 : 25, die wir für andere *Rhizopus*-Arten günstig fanden. Die Asparaginlösungen sind diesen Extrakten im Stickstoff gleichwertig. Zur Trennung der Faktoren verwendeten wir die Methode der Tierkohleadsorption. Die Adsorption wurde unter folgenden Bedingungen vorgenommen:

50 ccm Wasser + 155 mg Asparagin + 8 g Tierkohle.
50 ccm „ + 4 ccm WKE + 16 g „
Adsorptionsdauer $2\,^1/_2$ Stunden.

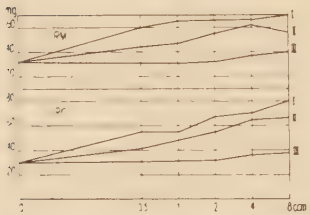


Fig. 23. Wachstum von *R. maydis* (RM) und *R. chinensis* (RC) unter dem Einflusse folgender Lösungen: I=WKE, II=WKE nach Tierkohlebehandlung, III= Asparaginlösung, die gleichviel N enthält wie der WKE.

Was früher gesagt wurde, ist damit bestätigt: der Faktor MR kann in seiner Wirkung auf *Rhizopus chinensis* und *R. may-*

dis nicht durch Asparagin ersetzt werden, auch dann nicht, wenn dieses Amid in viermal größerer Konzentration verwendet wird. Asparagin allein fördert das Wachstum ein wenig; doch beträgt die Zunahme nur einen kleinen Bruchteil der mit WKE beobachteten Werte. Der Faktor wird durch Tierkohle nicht aus dem WKE entfernt.

Die Wachstumszunahme, welche die untersuchten *Rhizopus*-Arten unter dem Einflusse der WKE zeigen, ist sehr wahrscheinlich nicht einer mineralischen Substanz zuzuschreiben. Während der Veraschung des WKE wird der Wirkstoff zerstört. Experimente mit Asparagin ermöglichen uns, innerhalb der Gattung *Rhizopus* zwei verschieden auf dieses Amid reagierende Gruppen zu unterscheiden. In eine erste reihen wir die Arten *Rhizopus oryzæ* und *R. suinus*. Bei ihr läßt sich die Wirkung des postulierten Faktors MR durch eine Asparaginlösung ersetzen. Diese muß gleichviel N enthalten wie der WKE. Zur zweiten Gruppe zählen wir *R. chinensis* und *R. maydis*. Auf sie übt eine entsprechende Asparaginlösung fast keinen Einfluß aus. Für diese *Mucorineen* ist das Vorhandensein des Faktors MR erwiesen. Unterwirft man eine Asparaginlösung einer Tierkohle- oder H_2O_2-Behandlung, dann beobachtet man, daß sie das Wachstum der *Rhizopus*-Arten weniger fördert. Die entsprechende Erscheinung ist auch vom WKE bekannt. In unserem Asparagin konnte weder eine das Wachstum fördernde, noch eine hemmende Substanz nachgewiesen werden. Die Versuche mit Asparagin und verschiedenen anderen N-Quellen machen es sehr wahrscheinlich, daß bei der ersten *Rhizopus*-Gruppe die MR-Wirkung einer N-Quelle zugeschrieben werden muß.

E. Die Faktorentrennung mit Fullererde B1 und MP, „Bios" und MR

1. Methodisches

Zur Beurteilung des Hefe-Wachstums und damit auch der Wirkung der Biosstoffe unserer Extrakte bedienen wir uns mit Vorteil eines Nephelometers nach Dr. B. Lange.

Zur Demonstration der Verhältnisse wählen wir eine Hefesuspension, die 76 % Licht absorbiert und stellen von ihr immer größere Verdünnungen her, dadurch, daß wir zu 10 ccm Hefesuspension schrittweise Wasser zugeben, bis zu 220 ccm.

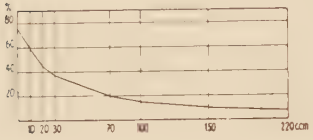


Fig. 24. Lichtabsorption einer Hefesuspension als Funktion der zu ihrer Verdünnung verwendeten Menge Wasser.
Ordinate: Lichtabsorption in %.
Abszisse: Wassermenge in ccm.

Diese Kurve lehrt zweierlei:

1. In größeren Verdünnungen (1 : 8 und 1 : 16) nimmt die Lichtabsorption der Hefesuspension proportional der Verdünnung ab, d. h. bei kleiner Hefekonzentration ist die Lichtabsorption der Hefemenge proportional.
2. In kleineren Verdünnungen ändert sich der Lichtabsorptionsgrad nicht mehr proportional der Wassermenge, deshalb ist bei größerer Hefekonzentration die Lichtadsorption der Hefemenge nicht mehr proportional.

Die Verhältnisse zwischen Lichtabsorption (LA) und Zahl der Hefezellen (HZ) sind die folgenden: Bis 40 % LA: Verdoppelung der HZ = Verdoppelung der LA, zwischen 40 und 60 %: Verdoppelung der HZ = 50 % Zunahme der LA, zwischen 60 und 76 %: Verdoppelung der HZ = 25 % Zunahme der LA.

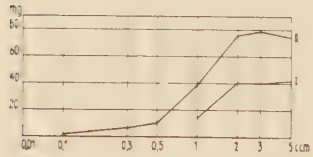


Fig. 25. *Saccharomyces cerevisiæ.* Vergleich der Gewichts- und Absorptionskurven.
Abszisse: WKE 1 : 100 in ccm.
Ordinate: I = Hefegewicht in mg,
II = Lichtabsorption in %.

Wie ein Vergleich der Hefegewichte mit ihren zur gleichen Zeit bestimmten Absorptionsprozenten zeigt, entsprechen konstanten Gewichtsmengen konstante Absorptionsprozente. Aus Figur 25 läßt sich die Uebereinstimmung von doppeltem Gewicht und doppelter Absorptionsprozent-Zahl nicht feststellen; denn mit dem Nephelometer lassen sich kleinere Hefemengen abschätzen als die, welche mit unserer Wägemethode noch genau bestimmt werden können.

2. Fullererde-Adsorption bei verschiedenem pH

Dagys 1935 (8) vergleicht seinen Hefewuchsstoff mit unserer auf *Phycomyces* wirksamen Stoffgruppe des WKE. Er findet, daß nur quantitative Unterschiede zwischen beiden bestehen. Einen solchen stellt er fest in der Adsorption der Wirkstoffe an Fullererde. Er beobachtet keine Veränderung des Hefewachstums nach Fullererdeadsorption, dagegen weist Schopfer eine schwache Abnahme bei *Phycomyces* nach. Dagys führt die Adsorption nicht in gepuffertem Milieu aus und gibt das exakte pH der Adsorption nicht an.

In unseren Versuchen mit Fullererde können wir, was die Hefe betrifft, die Resultate von Dagys bestätigen. Auch wir stellen nach der Adsorption keinen Unterschied fest gegenüber dem unbehandelten WKE. Nach Dagys steht diese Beobachtung in Uebereinstimmung mit den Ergebnissen von Williams und Bradway 1931. Diese Forscher berichten, daß zur Hefevermehrung der von der Fullererde nicht adsorbierte Biosstoff genüge. Dagys (8) vertritt die Auffassung, *Phycomyces* reagiere auf Aneurin und Bios. Die Herabsetzung des Wachstums dieses Pilzes beruhe auf der Adsorption des Aneurins. Die Entwicklung der Hefe bleibe unverändert, weil das Aneurin ohne Wirkung auf die Hefe sei und das Bios durch Fullererde nicht adsorbiert werde.

Die Versuche mit Tierkohle haben uns gezeigt, daß mit ihr jede Wirkung des WKE auf *Saccharomyces cerevisiæ* und auf *Phycomyces* aufgehoben wird. In der Fullererde (B.D.H. London) besitzen wir ein Adsorptionsmittel, von dem bekannt ist, daß es vor allem das Aneurin zu adsorbieren vermag. Diese Eigenschaft hat uns veranlaßt, zu untersuchen, ob eine weitere Trennung der Wirkstoffe des WKE möglich sei. Wir haben auch das Filtrat aus dieser Adsorption gegenüber drei Objekten zu prüfen: *Phycomyces* (Aneurin und Faktor MP), Hefe (Bios) und *Rhizopus* (Faktor MR).

Die Adsorption führten wir gleichzeitig bei verschiedenem pH aus (2.2; 3; 4; 4.6; 5; 6; 7; 8). Zu diesem Zwecke wurden in acht Zylinder je 10 ccm des WKE in der Verdünnung 1 : 5 gegeben und 10 ccm Pufferlösung zugefügt (Citronensäure und Na_2HPO_4). Die Fullererde bewirkt eine Zunahme des pH-Wertes. Zur Adsorption erhielt jede Lösung zwei Gramm der ge-

nannten Fullererde. Im beschriebenen Versuche beträgt die Adsorptionsdauer 23 Stunden. Tagsüber wurden die Zylinder ungefähr alle halben Stunden kräftig geschüttelt. Beim Stehen der Suspensionen konnte ein verschieden rasches Absinken der Erde beobachtet werden. Am schnellsten sinkt sie ab bei pH 2.2 und verlangsamt ihr Fallen stufenweise und regelmäßig bis pH 6. Bei weiterer Abnahme der Wasserstoffionen-Konzentration bleibt sie überhaupt suspendiert. Am Ende der Adsorption wurde die Fullererde abzentrifugiert und die Lösungen zu möglichster Klärung ultrafiltriert (Ultrafilter, schnell. Membranfiltergesellschaft) und auf 200 ccm ergänzt. In der Verdünnung 1 : 100 kamen die Wirkstofflösungen auf die drei Testobjekte in Anwendung, obwohl es für *Rhizopus* angezeigt gewesen wäre, das Verhältnis 1 : 25 zu wählen.

Wie die nächsten Figuren beweisen, gelingt mit Fullererde die Trennung der im WKE enthaltenen Wirkstoffe von *Phycomyces* und *Saccharomyces cerevisiæ*. In Figur 26 sind auf der Ordinate in Form eines Doppelstreifens die Trockengewichte der Myzelien in mg eingezeichnet, welche mit dem WKE 1 : 100 nach Fullererde-Adsorption erreicht wurden. Dabei bedeuten die Streifen links die Myzelgewichte, welche mit der maximalen (= 8 ccm), diejenigen rechts, welche mit der optimalen (= 2 ccm) Menge Wirkstoff erzielt wurden.

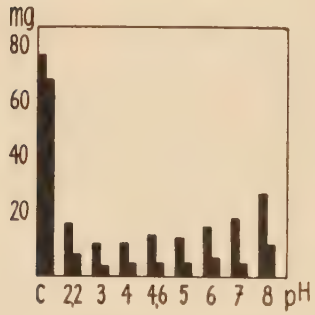


Fig. 26. Wachstum von *Phycomyces* als Funktion des WKE nach Adsorption mit Fullererde bei verschiedenem pH. C = Kontrolle.

Die Myzelgewichte, welche mit der optimalen Dosis Wirkstoff erzielt wurden, sind durchschnittlich dreimal kleiner als die der maximalen. Am besten konnten die auf *Phycomyces* wirksamen Stoffe bei pH 3 und 4 aus dem WKE entfernt werden. Mit der maximalen Menge Wirkstoff ist das Gewicht hier auf $^1/_5$ des unbehandelten WKE gesunken, mit der optimalen werden die Kontrollen (= ohne Wirkstoff) fast nicht überschritten.

Aus diesen Versuchen geht hervor, daß mit Fullererde die auf *Phycomyces* wirksamen Stoffe aus dem WKE entfernt werden können.

Aus Figur 27 ist ersichtlich, daß die für das Wachstum unserer Hefe maßgebenden Biosstoffe durch unsere Fullererde nicht absorbiert werden. Mit zunehmender Menge Wirkstoff steigt auch das Trockengewicht der Hefe regelmäßig an. Eine nephelometrische Messung dieses Wachstums zeigt uns noch die Absorptionsprozente einer unbehandelten WKE-Lösung. Ebenfalls eindeutig sind die Resultate des mit Fullererde behandelten

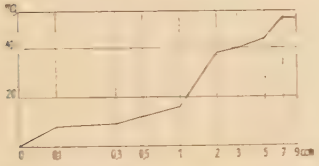


Fig. 27. Wachstum von *Saccharomyces cerevisiæ* unter dem Einfluß des WKE nach Fullererde-Adsorption. (Das Resultat gilt für alle pH-Werte).
Ordinate: Lichtabsorption in %.
Abszisse: Wirkstoff in ccm, Verdünnung 1 : 100.
Impfung: 1 Million Hefezellen auf 15 ccm Nährlösung.

WKE bei *Rhizopus oryzæ*, wenn man die Wirkstofflösung in maximaler Menge anwendet. Figur 28. Die mit 8 ccm Wirkstoff

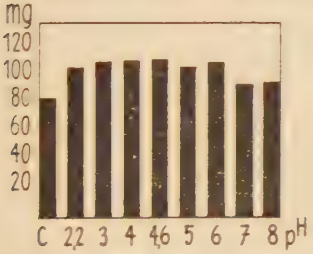


Fig. 28 Wachstum von *Rhizopus oryzæ* unter dem Einfluß des WKE nach Fullererde-Adsorption. (Wirkstoffverdünnung 1 : 100, 8 ccm konstant.) Die Wirkstofflösungen sind dieselben wie in Figur 26. C = Kontrolle.

erzielten Myzelgewichte sind durchschnittlich um 20 mg größer als die der Kontrollen, die einen Mittelwert aus 14 Myzelien darstellen.

Die auf den asparagin-empfindlichen *Rhizopus oryzæ* wirksamen Stoffe werden also durch Fullererde nicht aus dem WKE entfernt.

Gestützt auf diese Versuche ist es uns möglich, die Eigenschaften der verschiedenen Wirkstoffe des WKE zu präzisieren und die Trennung des Aneurins und des Faktors MP gegenüber dem Bios als abgeklärt zu betrachten. Für die verschiedenen Faktoren ergibt sich in Bezug auf die Adsorption folgendes Bild:

	Tierkohle	Fullererde
Aneurin und Faktor MP *(Phycomyces)*	+	+
Bios *(Saccharomyces cerevisiæ)*	+	—
Faktor MR *(Rhizopus oryzæ)*	—	—

Damit ist auch gezeigt, daß nicht das Bios auf *Phycomyces* wirkt (Wassink 1934 [5]), auch nicht als Faktor MP (Dagys 1935 [8]).

Bei der Tierkohlebehandlung sahen wir, daß es von der angewendeten Menge des Adsorptionsmittels abhing, ob noch Wirkstoff in Lösung blieb oder nicht. Da wir den Einfluß des WKE auf *Phycomyces* mit Fullererde bei maximalem Wirkstoffzusatz bis auf ca. $\frac{1}{10}$ haben reduzieren können, ist es für uns sehr wahrscheinlich, daß mit einer größeren Menge Fullererde auch hier aller Wirkstoff entfernt werden kann.

Mit der Tierkohle gelang es uns, den WKE von den Wirkstoffen für *Phycomyces* und *Saccharomyces cerevisiæ* zu befreien. Im Filtrat blieb der Faktor MR zurück. Mit dem zweiten Adsorptionsmittel, das etwas schwerer zu handhaben ist, gelingt es uns, den von der Tierkohle adsorbierten Komplex zu zerlegen. Die Fullererde entfernt demnach nur das Aneurin und den Faktor MP. Das Bios oder seine hauptsächlichste Komponente und der Faktor MR (*R. oryzæ*) bleiben im Filtrat. Mit der Fullererde kann im WKE selber gezeigt werden, daß das Bios nicht auf *Phycomyces* wirkt, was heute als sicher gelten darf (Kögl und Fries).

F. Oxydation im Weizenkeim-Extrakt mit H_2O_2. Das Verhalten des Aneurins, der Faktoren MP und MR und des Bios

Nun sind wir in der Lage, weitere Eigenschaften des Faktors MR zu untersuchen. Wir werden im folgenden dartun, wie wir durch eine kräftige Oxydation des WKE zum Faktor MR gelangen können. Es gelingt uns, dank der Oxydationsbeständigkeit des Faktors MR, verschiedene Wirkstoffe von einander zu trennen.

Bevor wir unsere Versuche mit H_2O_2 beschreiben, verfolgen wir entsprechende Experimente anderer Autoren. In der *Rhizopin*lösung von Nielsen (20) wird die Wuchsstoffwirkung durch eine direkte H_2O_2-Behandlung zerstört. 1932 (22) veröffentlicht derselbe Forscher Versuche mit Extrakten aus *Boletus edulis*. Auch in diesem Objekt zerstört er die Auxinwirkung, oder, wie er sie nennt: A-Wuchsstoffwirkung, für welche

die *Avena*koleoptile der Test ist. Nielsen und Hartelius 1932 (24) trennen in einer Kulturlösung von *Rhizopus* mit H_2O_2 zwei Wuchsstoffwirkungen (20 ccm *Rhizopus*lösung + $^1/_2$ ccm H_2O_2). Die A-Wirkung geht verloren, während die auf *Aspergillus niger* bestehen bleibt. Die Stoffe, welche bei *Aspergillus niger* auf die Produktion von Trockensubstanz wirken, nennt Nielsen B-Wuchsstoffe. Nielsen und Hartelius 1932 (24) weisen nach, daß der synthetische Wuchsstoff B beim Erhitzen mit H_2O_2 nicht zerstört wird (40 ccm Wuchsstofflösung + 1 ccm H_2O_2, 30%ig). Bei diesem Experiment sind die verwendeten Lösungen zweiprozentig und werden gewöhnlich eine Stunde auf 135° erhitzt. Dieselben Autoren finden 1934 (26), daß die in der Bierwürze enthaltene ätherunlösliche Wachstumssubstanz der Gruppe B, welche die Zunahme des Trockengewichtes der Hefe verursacht, durch Erwärmen mit H_2O_2 nicht zerstört wird. (Erwärmen bedeutet in dieser Arbeit aber erhitzen; es wird auf 135° erwärmt).

Nielsen 1932 (22) zerstört mit H_2O_2 den im Extrakt von *Boletus edulis* enthaltenen Stoff, welcher die Krümmung der *Avena*koleoptile bewirkt. Almoslechner 1934 (1) weist in diesem Pilze einen Hefewirkstoff nach. Um ihn einer der Gruppen von Nielsen zuteilen zu können, führt sie folgende Oxydation aus: zu 4 ccm Pilzextrakt gibt sie 1 ccm H_2O_2 und dampft diese Lösung vollständig ein. Mit 4 ccm Wasser nimmt sie den Rückstand wieder auf. Durch diese Behandlung wird der Hefewirkstoff nicht oxydiert. Sie gliedert ihn deshalb der B-Wirkstoff-Gruppe von Nielsen an. Mit einer andern Versuchsanordnung gelingt es ihr scheinbar, das Bios zu zerstören. Wir haben die Oxydation unter denselben Bedingungen wiederholt und fanden mit $KMnO_4$ noch etwa die Hälfte des H_2O_2 in Lösung.

Dagys 1935 (8) gelingt es, in Extrakten aus Getreidesamen und *Boletus* durch Oxydation mit H_2O_2 die Hefewirkstoffe zu zerstören. In Bezug auf die Menge Extrakt verwendet Dagys weniger H_2O_2 als Almoslechner. Wir kennen in beiden Fällen die zu oxydierende Trockensubstanz nicht; die Oxydationsdauer ist verschieden, sodaß ein Vergleich schwer fallen würde. Keiner der Autoren erwähnt, ob er sich vergewissert hat, daß kein H_2O_2 mehr im Extrakt ist. Dagys führt seine Oxydation auf dem Wasserbad aus.

Die verfolgten Erscheinungen sind also sehr verschieden. Es ist ungewiß, ob die beschriebenen und auf Hefe wirksamen

Substanzen identisch sind. Die auf die Oxydationsbeständigkeit untersuchten Stoffe werden auf verschiedene Teste angewendet. Schon diese Tatsache erübrigt einen Vergleich, bevor nachgewiesen ist, daß die geprüften Substanzen übereinstimmen. Almoslechner, Nielsen und Hartelius können die Biosstoffe nicht zerstören, weder in *Boletus edulis*, noch in Bierwürze. Dagys hingegen zerstört die genannten Stoffe sowohl in *Boletus edulis* als in einem weiteren Extrakt aus Getreidesamen. Unsere Oxydation im WKE verfolgt 3 Ziele:

1. Lassen sich die Wirkstoffe des WKE (Aneurin, Faktor MP) zerstören?
2. Werden die Biosstoffe oxydiert?
3. Was geschieht mit dem Faktor MR?

Bei unseren ersten Oxydationsversuchen arbeiteten wir ebenfalls mit dem Wasserbad. Zu 10 ccm unseres WKE. in der Verdünnung 1 : 10 (Trockensubstanz ca. 0.9 g) fügten wir 4 ccm 30%iges H_2O_2 hinzu. Nach zweistündiger Wasserbadbehandlung blieb noch unzerlegtes Peroxyd zurück, wie eine Probe mit Katalase ergab. Katalase erwies sich selber zur Entfernung des H_2O_2 als unanwendbar, da in ihr enthaltene Stoffe *Phycomyces* zum Wachstum aktivieren. 8 ccm einer Katalasesuspension (0.5 g Katalase auf 50 ccm Wasser) ermöglichten 50 mg Trockenmyzel. Aus diesem Grunde dampften wir die Lösung vollständig ein, wobei sich ein weißer Rückstand absetzte, der bei weiterem Eindicken braun wurde (Caramelisierung des Zuckers?). Nach längerem Trocknen nahmen wir die Masse so lange mit Wasser auf, bis die Verdünnung 1 : 100 betrug. So behandelte Trockenrückstände ermöglichten bei *Phycomyces* noch ein Gewicht von 30 bis 40 mg, bei maximalem Zusatz von 8 ccm Wirkstofflösung.

Mit Hefe erreichten wir noch ein Wachstum, das im Nephelometer eine Absorption von 70 % hervorrief; das ist nahezu der Wert, welcher mit dem unbehandelten WKE erreicht wird.

Da sich diese Wasserbadbehandlung unzureichend erwies zur Zerstörung des in unserem WKE enthaltenen Bios und Aneurins, verwendeten wir ein Salzbad. Mit ihm war es möglich, den Siedepunkt der Lösung (WKE — H_2O_2) zu erreichen. Eine Gegenüberstellung der verschiedenen Oxydationsarten möge ihren Einfluß auf die Biosstoffe hervorheben.

Tabelle 11. Wachstum von *Saccharomyces cerevisiae* als Funktion verschieden oxydierter WKE.

Wirkstoffmengen in ccm	1	2	4	8
Wachstum gemessen in Absorptionsprozenten				
1. WKE $^1/_{100}$	18	58	77	80
2. WKE, mehrmalige H_2O_2-Behandlung Wasserbad	5	10	38	63
3. WKE plus H_2O_2, Salzbad, 1 Stunde	—	—	—	16
4. WKE + H_2O_2, Salzbad, 3 Stunden mit 3×4 ccm H_2O_2	Spuren von Hefe am Boden			

Auffällig ist die Abnahme des Hefewachstums nach einer einstündigen H_2O_2-Behandlung des WKE im Salzbad. Es war nicht zum vornherein ausgeschlossen, daß diese Abnahme nicht eine Folge der Hitze sei. Daß die Temperatur nicht die Ursache der Bioszerstörung ist, ergaben Kontrollversuche, bei welchen der WKE nur der Hitze ausgesetzt wurde. Der so behandelte Extrakt zeigte keine Veränderung der Wirkstoffe. Hingegen beschleunigt die erhöhte Temperatur die Oxydation.

Die beschriebene Versuchsanordnung befriedigte nicht, weil wegen der Salzanreicherung die Temperatur des Bades nicht konstant gehalten werden konnte. Ferner verunmöglichten Oxydationsprodukte, welche dem Extrakte eine dunkelbraune Farbe verliehen, eine nephelometrische Messung des Hefewachstums. (Auf *Phycomyces* und *Rhizopus* waren auch diese Extrakte anwendbar.) Wir mußten daher die Entfernung der Substanzen anstreben, welche die Braunfärbung des Extraktes hervorriefen. Wir schrieben die Bräunung des Extraktes den veränderten Zuckern zu. Die ausgeführten Zuckerfällungen überzeugten uns von der Richtigkeit unserer Annahme. Nach dieser Reinigung der WKE-Lösung trat während der Oxydation keine Bräunung mehr ein.

In dem Mengenverhältnis - Wasser des WKE zu Methanollösung — besitzen wir die Möglichkeit, die Menge des gefällten Zuckers zu variieren. Wir führten eine, diese Tatsache berücksichtigende, Zuckerfällung aus und prüften den so behandelten Extrakt auf unsere Testobjekte. Der Zuckerfällung geht eine Inversion voraus. Nach der Fällung waren in 100 ccm WKE 1 : 25 noch

150 mg reduzierender Zucker nachzuweisen, gegenüber ca. 700 mg vorher. Unter dem Einflusse dieses Präparates zeigte *Phycomyces* ein normales Wachstum, sodaß parallel dazu mit Hefe erhaltenen Resultaten Vertrauen geschenkt werden kann. Bei diesen durch Zuckerfällung erzielten Extrakten prüfen wir nun die Oxydationsbeständigkeit des Bios. Folgende Zusammenstellung zeigt unsere endgültige Oxydationsmethode: Zu 25 ccm WKE 1 : 25 geben wir 4 ccm 30 %iges H_2O_2. Die Lösung wird zwei Stunden am Rückflußkühler gekocht. Das verwendete Oelbad hat eine durchschnittliche Temperatur von 160°. Die Lösung im Kolben siedet bei ca. 103°. Nach dieser Behandlung wird die nun hellgrüne Wirkstofflösung auf dem Wasserbad eingedampft. Ist alle Flüssigkeit verflüchtigt, dann wird der Rückstand noch wenigstens eine Stunde auf dem Wasserbade gelassen. Der Rückstand wird mit Wasser auf die gewünschte Verdünnung gebracht.

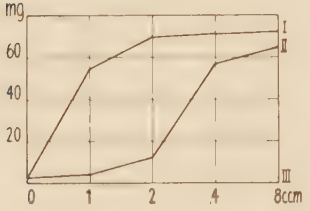


Fig. 29. Wachstum von *Saccharomyces cerevisiæ* als Funktion folgender Lösungen:
I – WKE, II – WKE + Inversion + Zuckerfällung.
III – II + Oxydation.
Ordinate: Lichtabsorption der Hefe in %.
Abszisse: Wirkstofflösungen in ccm.

Nach dieser Oxydation zeigt der teilweise von Zuckern gereinigte WKE keine Wirkung mehr auf Hefe. Wie aus demselben Versuch hervorging, werden auch das Aneurin und der Faktor MP vollständig oxydiert. Mit keiner WKE-Menge bildet *Phycomyces* mehr Myzel als in der Kontrolle. Durch diese Methode kann nicht festgestellt werden, ob der durch seine Hitzebeständigkeit charakterisierte Faktor MP existiert. Es sind von uns keine dahingehenden Versuche unternommen worden, ob das Aneurin oder das Bios schwerer zu oxydieren sei.

Im WKE lassen sich mit dieser Oxydationsmethode die auf *Phycomyces* und Hefe wirksamen Stoffe nicht trennen. Wir haben jetzt die zwei ersten Ziele unserer Oxydation erreicht. Im folgenden wenden wir uns dem Faktor MR zu und seinem Verhalten gegenüber unserer Oxydation. Unserem Arbeitsgange entsprechend sind drei verschiedene Produkte mit einander zu vergleichen und in ihrer Wirkung auf zwei Gruppen von *Rhizopus*-Arten zu prüfen. Erschwert wird die Beurteilung dadurch, weil zu glei-

cher Zeit zu berücksichtigen ist, daß die Oxydation an verschiedenen WKE ausgeführt worden ist.

Das erste Oxydationsprodukt (Wasserbad) zeigt in der Wirkung keine Abweichung vom unbehandelten WKE. Der Test: *Rhizopus oryzæ* gehört der asparagin-empfindlichen *Mucorineen*-gruppe an.

Das zweite Oxydationsprodukt (Oelbad) wurde aus dem WKE IV (nach der bereinigten Oxydationsmethode S. 54) hergestellt. Dieser WKE unterscheidet sich von den andern dadurch, daß er einen geringen Einfluß ausübt auf *Rhizopus* und daß seine Wirkung nach einer Tierkohleadsorption sprunghaft anwächst. Deshalb fanden wir es für angezeigt, den Einfluß des Oxydationsproduktes mit einem WKE und einem WKE nach Tierkohleadsorption zu vergleichen. Aus Figur 30 ersehen wir, daß die H_2O_2-Behandlung die Wirkung des WKE IV (gemessen nach Tierkohleadsorption) um das Achtfache verringert. Das Oxydationsprodukt übertrifft aber in seiner Wirkung den unbehandelten WKE immer noch deutlich (8 ccm WKE IV nach Oxydation geben dasselbe Trockengewicht wie 1 ccm nach Tierkohleadsorption oder 4 ccm dasjenige von 0,5 ccm nach Tierkohlebehandlung).

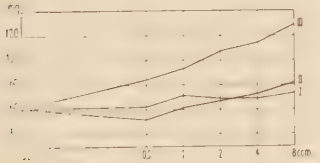


Fig. 30. Wachstum von *Rhizopus oryzæ* unter dem Einflusse: I = WKE, II = Oxydationsprodukt des WKE, III = WKE nach Tierkohleadsorption.

Wie man sich erinnert, ist der hier kultivierte *Rhizopus* asparagin-empfindlich. Daß mit einer oxydierten WKE-Lösung nicht mehr dieselben Pilztrockengewichte erzielt werden können wie mit einer unbehandelten, kann durch die teilweise Zerstörung des Asparagins erklärt werden. (Asparagin-Oxydation, S. 42). Dagegen ist man versucht, die nur schwach fördernde Wirkung des WKE IV auf eine größere Menge Aneurin im WKE zurückzuführen. Dieser vermehrte Gehalt an Vitamin B 1 müßte dann aber in einem Vergleich zweier Extrakte zum Ausdruck kommen. Figur 31 zeigt, wie sich die Extrakte IV und V in ihrer Wirkung auf *Phycomyces* decken. Wir sind also nicht berechtigt, einer Zunahme an Wirkstoffen, die das Wachstum von *Phycomyces* auslösen, die Hemmung von *Rhizopus* zuzuschreiben.

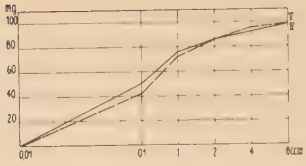


Fig. 31. Vergleich des Wachstums von *Phycomyces* als Funktion des WKE IV und WKE V.
Ordinate: Myzelgewicht in mg.
Abszisse: WKE 1 : 100 in ccm.
(0,5 anstatt 0,1).

Das dritte Oxydationsprodukt hat eine längere Behandlung hinter sich (Hydrolyse, Zuckerfällung und Oxydation). Der WKE wurde, bevor wir ihn der Oxydation aussetzten, einer Säureinversion unterworfen (80 ccm WKE 1 : 25 + 15 ccm H_2SO_4 n. zwei Stunden im Wasserbad). Die Farbe des WKE war nach dieser Behandlung dieselbe wie vorher. Diese Inversion verändert die Wirkstoffe des WKE nicht, wie Versuche mit solchen Produkten zeigten. (Diese Feststellung gilt für diejenigen WKE, in denen die Zuckerfällung ausgeführt wurde, ebensogut, wie für unbehandelte).

Die Säureinversion führen wir durch, um in unsern Zuckerbestimmungen (nach Bertrand) vergleichbare Resultate erzielen zu können. Wir drücken den Zuckergehalt des WKE immer in Glucosemengen aus. Wie wir schon öfters betonten, ist aber die Saccharose der Hauptzucker des Keimes. Zuckerbestimmungen in den fertigen WKE ergaben sehr verschiedene Glucose-Mengen. Durch die oben beschriebene Hydrolyse umgehen wir diese Verschiedenheit, welche der WKE aufweist, weil die Zubereitung nicht unter streng konstanten Bedingungen vor sich geht. Durch im Keime enthaltene Enzyme kann der Saccharosegehalt verändert werden, ebenso durch die Essigsäure, die während der Bleifällung aus dem Azetat zurückgebildet wird; denn auf diese Fällung folgt noch das Eindicken zum Sirup.

Nach der Säurehydrolyse im WKE führten wir eine Zuckerfällung aus und erst nach dieser Vorbehandlung des Extraktes setzten wir die Oxydation an. Dadurch vermieden wir die früher beschriebene Braunfärbung und erzielten eine durchgreifendere Oxydation.

Um die Eigenschaften des derart behandelten WKE möglichst eingehend beurteilen zu können, haben wir seine Wirkung auf alle Teste geprüft *(Phycomyces,* Hefe, *Rhizopus).*

Wir beschreiben im folgenden die Resultate, welche wir bei *Phycomyces, Saccharomyces cerevisiæ* und *Rhizopus maydis* mit denselben Wirkstofflösungen erzielten. Es sind:

I = WKE. II = WKE nach Inversion und Zuckerfällung, III = II nach Oxydation.

Hefe wächst bekanntlich mit I sehr gut: Lösung II gibt erst in der maximalen Menge Wirkstoff das stärkste Wachstum, weil bei der Zuckerfällung Wirkstoff verloren geht; mit III findet keine Entwicklung statt.

Phycomyces wächst mit I wie gewohnt; mit II erreicht er, aus denselben Gründen wie die Hefe, das maximale Myzelgewicht erst bei 8 ccm; mit III findet kein Wachstum statt.

Die Oxydation zerstört also die auf Hefe und *Phycomyces* wirksamen Stoffe vollständig.

Figur 32 gibt die Ergebnisse für *Rhizopus maydis*. Wie alle unsere WKE. so besitzt auch der unbehandelte WKE VII auf das Wachstum der *Rhizopus*-Arten eine fördernde Wirkung. Da *Rhizopus maydis* nicht der auf Asparagin empfindlichen Gruppe angehört, besitzen die Resultate der Figur 32 volle Gültigkeit. Die Vergleichslösung zum oxydierten Produkt ist: WKE + Inversion + Zuckerfällung. Die Kurve mit dem WKE allein dient wiederum als Vergleich zum letztgenannten Präparat.

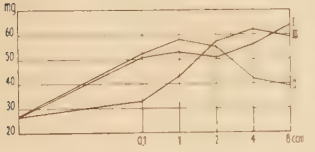


Fig. 32. Wachstum von *Rhizopus maydis* unter dem Einfluß folgender Extrakte: I = WKE, II = WKE + Inversion + Zuckerfällung, III = WKE + Inversion + Zuckerfällung + Oxydation.
Abszisse: Extrakte in ccm (0,5 nicht 0,1 — 8 ccm), Verdünnung 1 : 25
Ordinate: Myzelgewicht in mg.

Bis zur Menge von 2 ccm decken sich die Wirkungen des WKE und des WKE nach Inversion und Zuckerfällung. Hierauf nimmt die Wirkung des letztgenannten Extraktes stark ab. Anders ist der Einfluß dieses Produktes nach unserer Oxydation. Erst steht der Wert unter den Vergleichsserien, übersteigt aber bei 2 ccm Wirkstoff selbst den unbehandelten Extrakt, um am Ende der Kurve eine kleine Abnahme zu verzeichnen. Wir fragen uns, worauf die Verminderung der Wirkung des WKE nach Inversion und Zuckerfällung beruht, wenn er in größeren Mengen der Nährlösung zugeführt wird? Mit einem Universalindikator haben wir das pH der beiden Wirkstofflösungen gemessen. Es beträgt pH 5,9 für das letztgenannte Produkt und pH 5,6 für dasselbe nach Oxydation. Nehmen wir an, daß diese Werte den Tatsachen entsprechen, dann können wir uns nicht gut vorstellen, daß einmal die geringe pH-Differenz eine so starke Zunahme, das andere Mal eine solche Abnahme der Wirkung bedingen kann. Später ohne

Wirkstoff ausgeführte Versuche haben ergeben, daß der hier verwendete Pilz zwischen pH 5 und pH 6 dasselbe Myzelgewicht liefert.

Folgende Erklärung scheint nicht ausgeschlossen zu sein: Es ist möglich, daß der in Frage kommende Stoff nur bis zu einer bestimmten Menge Wirkstoff ist, darüber hinaus aber Giftwirkung besitzt. Das mit dem Oxydationsprodukt des WKE nach Inversion und Zuckerfällung erzielte Resultat läßt sich dann folgendermaßen deuten: Durch die Oxydation wird der auf *Rhizopus maydis* wirksame Stoff teilweise zerstört; dies äußert sich in den Myzelgewichten, welche mit den kleinen Mengen Wirkstoff erzielt wurden. Es wird dabei gerade so viel des wirksamen Stoffes zerstört, daß der Rest das Wachstum nur noch zu fördern vermag. Eine Andeutung einer Hemmung kann jedoch auch schon in Figur 32 abgelesen werden.

Als wichtiges Resultat halten wir fest, daß der Faktor MR auch durch unsere kräftige Oxydation — im WKE nach Zuckerfällung — nur teilweise zerstört wird. Mit dieser Oxydation können die Wirkstoffe, welche das Wachstum von *Phycomyces* fördern, nicht von denjenigen der Hefe getrennt werden. Hingegen gelingt die ebenso wichtige Trennung in Wirkstoffe für *Phycomyces* und Hefe einerseits, in solche der *Rhizopus*-Arten anderseits.

Wir haben Extrakte aus *Boletus edulis* ebenso auf unsere drei Testobjekte untersucht. Alle wurden stark gefördert. Die Extraktzubereitung ist folgende: Der Pilz wird in Stücke geschnitten, getrocknet, zu Pulver zerrieben, dieses 15 Minuten mit Wasser ausgekocht, filtriert und auf die gewünschte Verdünnung

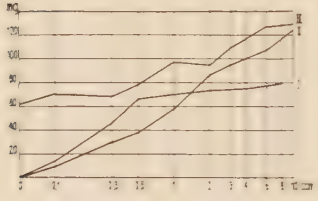


Fig. 33. Wachstum von *Phycomyces* und *Rhizopus oryzæ* unter dem Einfluß eines Extraktes aus *Boletus edulis*.
I = *Phycomyces* mit WKE.
II = *Phycomyces* mit *Boletus*-Extrakt.
III = *Rhizopus oryzæ* mit *Boletus*-Extrakt.

gebracht. 4 g Pilzpulver = ca. 50 g Frischpilz = 50 ccm Wirkstofflösung. Wir ersehen aus Figur 33, daß bis zu 1 ccm *Boletus*-Extrakt die Myzelgewichte von *Phycomyces* mit denen übereinstimmen, die mit gleichen Mengen WKE erzielt werden.

Mit größeren Volumen *Boletus*-Extrakt wird dann noch ein zusätzliches Wachstum erreicht. Aus der eben angeführten Feststellung und weil die Kurve nicht die Form einer Optimumkurve besitzt — eine Erscheinung, die wir aus Versuchen mit dem WKE schon kennen — glauben wir schließen zu dürfen, daß dieses zusätzliche Wachstum dem Stickstoff des Extraktes zu verdanken ist. Für *Rhizopus oryzæ* gilt sehr wahrscheinlich etwas Aehnliches. Wir wissen jetzt, daß sein Wachstum stark von N-Quellen abhängig ist.

Durch Oxydation mit H_2O_2 gelingt es uns auch im *Boletus*-Extrakt, die auf Hefe und *Phycomyces* wirksamen Stoffe zu zerstören. *Rhizopus oryzæ* besprechen wir nicht, da er stickstoffempfindlich ist. Wir können demnach die Resultate von Dagys bestätigen. In Extrakten von *Boletus edulis* muß dem Bios die Förderung der Hefe zugeschrieben werden und nicht den B-Substanzen von Nielsen, wie Almoslechner glaubt.

Unsere Oxydationsmethode erlaubt, sowohl im WKE wie im *Boletus*-Extrakt, die auf *Phycomyces* und Hefe wirksamen Stoffe zu zerstören. (Vitamin B1, Faktor MP, Biosstoffe). Nur teilweise zerstört wird der Faktor MR, der Wirkstoff der *Rhizopus*-Arten. Diese Oxydation gestattet in beiden Extrakten die Trennung des Faktors MR von den Wirkstoffen, die bei *Phycomyces* und Hefe das Wachstum auslösen.

Nielsen und Hartelius 1937 (29) behandeln eine Kulturlösung, auf der *Aspergillus niger* gewachsen ist und Bierwürze mit H_2O_2. In beiden Produkten wird der auf *Aspergillus niger* wirksame Stoff wenig verändert. In der Kulturlösung können die Biosstoffe ganz, in der Bierwürze teilweise zerstört werden. Diese Erscheinung schreiben die Forscher einer Hemmung des Oxydationsmittels zu, welche bedingt ist durch die vielen Begleitsubstanzen der Bierwürze.

Diese Versuche stellen eine Parallele dar zu unseren Experimenten. In beiden Fällen gelingt es, zwei Wirkstoff-Gruppen zu trennen, die sich durch ihre Oxydationsbeständigkeit unterscheiden. Nielsen und Hartelius zerstören ebenso wie wir das Bios. Die der Oxydation widerstehende Gruppe unterscheidet sich scheinbar von der unsrigen, dadurch, daß sie auf *Aspergillus* wirkt, die unsrige dagegen auf *Rhizopus*.

G. Versuche mit Stoffen, die Analogien zum Faktor MR aufweisen

Die folgenden Versuche wurden ausgeführt mit Substanzen, die als Ersatz für unsern Faktor MR in Frage kommen können.

1. Lactoflavin.

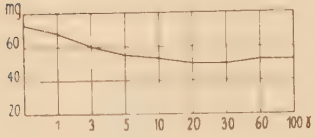


Fig. 34. Einfluß des Lactoflavins (Vitamin B 2) auf das Wachstum von *Rhizopus oryzæ*.
Abszisse: Lactoflavin in γ
Ordinate: Myzelgewicht in mg.

Die Kurve zeigt, daß dem Vitamin B 2 in größern Mengen eine wachstumshemmende Funktion zukommt.

2. Brenztrauben- und Glykolsäure. Das sind Substanzen, mit denen Nielsen seine B-Wuchsstoffe ersetzen kann. Sie sind ohne Wirkung auf Hefe. Wir lösten in 200 ccm Wasser: a) 0.1 ccm Brenztraubensäure, b) 100 mg Glykolsäure. Von diesen Lösungen gaben wir steigende Mengen zur Nährlösung ($^5/_{100}$—4 ccm). Wir setzten folgende Reihen an: Brenztraubensäure, Glykolsäure, Brenztrauben- + Glykolsäure (je die Mengen der einfachen Reihen). Auf *Rhizopus oryzæ* sind diese Substanzen ohne Einfluß.

3. Nach Nielsen 1936 (28) fördert die Ascorbinsäure (c) den Einfluß der Brenztrauben- (a) und der Glykolsäure (b). Wir haben diese Kombination ebenfalls geprüft. Wir verwendeten folgende Lösungen: Ascorbinsäure 20 γ im ccm, Brenztraubensäure und Glykolsäure je 1 mg im ccm. In den Mengen von 0—4 ccm allein und in den Kombinationen a + b und a + b + c üben sie keinen Einfluß aus auf *Rhizopus maydis*.

4. Knigth 1937 (14) findet bei *Staphylococcus aureus* Nicotinsäure und ihr Amid als Wirkstoffe. Wir untersuchten, ob diese Verbindungen wie auch Pyridin unsere *Rhizopus*-Arten beeinflussen. Die Nicotinsäure und ihr Amid verwendeten wir in Lösungen, die 20 γ der Substanz in 1 ccm enthielten. Die Pyridinlösung enthielt 1 γ im ccm. Alle drei Verbindungen wurden einzeln und in abgestuften Mengen dem Milieu zugeführt ($^5/_{100}$—8 ccm). In keiner Reihe überschritt das Myzelgewicht von *Rhizopus maydis* und *R. chinensis* das der Kontrolle.

5. Kommen Betaïn und Cholin als N-Quellen in Frage? Wir prüften diese Substanzen als Chloride. Auf 100 ccm Wasser gaben wir 610 mg Cholinchlorid und 542 mg Betaïnchlorid. Diese Lösungen entsprechen dem WKE VII im Stickstoff. Auf *Rhizopus chinensis* sind diese Chloride ohne Wirkung innerhalb $^5/_{100}$—8 ccm.

IV. Besprechung der Resultate

Schopfer schloß aus dem verschiedenen Verhalten von *Phycomyces* und der *Rhizopus*-Arten, dem WKE und dem Aneurin gegenüber, daß im WKE ein zweiter Wirkstoff vorhanden sei. Er nannte ihn Faktor M.

Auf einem anderen Wege kam er zum Schlusse, daß *Phycomyces* sehr wahrscheinlich neben Aneurin auf einen zweiten Faktor empfindlich sei. Schopfer und Jung 1936 (46) zeigten, daß ein WKE nach zwanzigstündigem Erhitzen auf 128° noch eine deutliche Wirkung (25 %) auf *Phycomyces* besaß. Das Tier (Ratte) reagierte nicht mehr auf den so behandelten Extrakt. Mit dem Tiertest bestimmten sie im Gramm WKE 11 γ Vitamin B 1. Dagegen berechnet Schopfer im Gramm WKE 13,6 γ Aneurin, wenn er die Myzelgewichte von *Phycomyces* mit denjenigen vergleicht, welche der Pilz unter dem Einflusse einer Standardlösung von Vitamin B 1 erreicht. Ein Teil der Wirkung dieses „zusätzlichen Aneurins" ist sicher dem im WKE enthaltenen Stickstoff zuzuschreiben. Diese beiden Wirkungen (25 % und 20 %) sind in der Größe auffallend ähnlich. Es scheint deshalb sehr wahrscheinlich, daß der WKE einen weiteren Faktor enthält. Er ist ebenfalls durch Tierkohle adsorbierbar, zeichnet sich aber durch eine beträchtliche Hitzebeständigkeit aus. Dieser auf *Phycomyces* wirksame Faktor erhielt die Bezeichnung MP.

Es ist uns gelungen, die auf *Phycomyces* wirksamen Stoffe des WKE (Vitamin B 1 und Faktor MP) von denen bestimmter *Rhizopus*-Arten zu trennen. Die nicht oxydierten und nicht adsorbierten Stoffe wirken auf *Rhizopus maydis* und *R. chinensis*. Wir fassen sie zusammen als Faktor MR.

Dagys versucht, seinen Hefewuchsstoff mit unserem Faktor MP zu identifizieren (8,9).

Schopfer 1936 (48) bespricht die Ueberlegungen, welche Dagys zur Annahme geführt haben, es bestehe Uebereinstimmung zwischen unserem Faktor M und dem Hefe-Faktor. Er folgert, weil sich Pantothensäure und Meso-Inositol (Bios I) unwirksam auf *Phycomyces* gezeigt haben: Wenn der Faktor von Dagys identisch ist mit der Pantothensäure und dem Biotin, dann kann er nicht übereinstimmen mit unserem Faktor M. Wird dagegen Identität zwischen den beiden Faktoren angenommen, dann muß der Hefewuchsstoff von Dagys etwas anderes sein als Biotin und Pantothensäure.

Dagys 1937 (10) bleibt bei seiner Annahme: „Mir scheint, daß für *Phycomyces* sowohl das Vitamin B 1 als auch der Faktor MP (meines Erachtens gleich meinem Hefewuchsstoff) zur normalen Entwicklung notwendig ist, jedoch schon eines davon genügt, um das Wachstum auszulösen, wobei der Pilz das andere selber synthetisiert."

Dagys 1935 (8) hat nach demselben Verfahren wie Schopfer festgestellt, daß sein Hefewuchsstoff durch Fullererde nicht adsorbiert wird. „Durch Autoklavieren mit Alkali oder Behandlung mit Fullererde wird das Vitamin B 1 eliminiert, das Bios bleibt unbeschädigt im Extrakt. Daher die Herabsetzung der Wirkung auf *Phycomyces* und keine Aenderung der Wirkung auf Hefe".

Aus unseren Versuchen S. 47—50 (die Adsorption mit Fullererde wurde unter anderen Bedingungen als bei Dagys ausgeführt: pH, Temperatur, Zeit) geht hervor, daß es mit Fullererde (B. D. H., London) sehr wahrscheinlich möglich ist, alle auf *Phycomyces* wirksame Substanz aus dem WKE zu entfernen. Das Wachstum der Hefe ist aber trotzdem dasselbe wie vor der Adsorption.

Es ist daher wahrscheinlich, daß die Annahme von Dagys, das Bios fördere das Wachstum von *Phycomyces* und Hefe zugleich, der Grundlagen entbehrt. Es kann demnach auch nicht Identität bestehen zwischen dem Faktor MP und dem Hefewuchsstoff von Dagys.

Kögl 1937 (17) zeigt, daß Biotin (Bios II) auch in Verbindung mit Aneurin das Wachstum von *Phycomyces* nicht akti-

viert. Damit ist bewiesen, daß keine der bekannten Bios-Komponenten für *Phycomyces* ein Wirkstoff ist.

Dagys 1937 (10) will seine Auffassung von der Wirkung des Bios stützen durch einen Hinweis auf Versuche von Ronsdorf 1935. Diese prüft den Einfluß einer sogenannten Bioslösung auf das Wachstum von 16 Pilzen. Sie hat die Lösung nach der Methode von Wassink (unsere Methode des WKE) aus Bäckerhefe hergestellt. Es ergibt sich, daß durch das Bios elf Pilzarten gefördert und einige gehemmt werden. Sie betrachtet das von Kögl dargestellte Biotin als wirksames Prinzip der Bioslösung. Wir wissen, daß durch ihre Methode das Vitamin B 1 nicht aus der Lösung entfernt wird; ebenso geht aus unserem WKE hervor, daß der Extrakt noch viele andere Stoffe enthalten muß. Das zeigt auch der hemmende Einfluß auf einige Pilze. Kögl 1937 (17) weist bei einem der Pilze, *Phytophthora cactorum*, welcher nach Ronsdorf durch die Bioslösung gefördert wird, nach, daß Biotin ohne Wirkung ist. Sehr wahrscheinlich ist das Aneurin für den beobachteten Einfluß verantwortlich zu machen. Die Versuche von Ronsdorf können demnach nicht zeigen, daß Hefe und Pilze durch denselben Wirkstoff beeinflußt werden.

In einem Fall, der dem Verhältnis parallel gesetzt werden kann, welches zwischen unserem Faktor MR und dem der Hefe besteht, lehnen Nielsen und Hartelius 1937 (29) gegenüber Dagys ab, daß Bios sowohl auf Hefe als auch auf *Aspergillus niger* wirke. Sie zerstören in einer Nährlösung, auf der *Aspergillus niger* gewachsen ist, ihr „Wuchsstoff-Präparat", durch Oxydation mit H_2O_2 oder $KMnO_4$ die auf Hefe wirksamen Stoffe. Mit H_2O_2 bleibt die Wirkung auf *Aspergillus niger* unverändert, mit $KMnO_4$ wird sie erhöht, was z. T. dem Mn zuzuschreiben ist. Diesen Forschern gelingt es ferner, durch Ausschütteln der Wirkstofflösung mit Hefe oder Aspergillus-Myzel, die beiden aktiven Substanzen zu trennen.

Eine ähnliche Trennung (Tierkohleadsorbtion und Oxydation) führen wir im WKE aus und gelangen zum Faktor MR. Durch unsere H_2O_2-Behandlung zerstören wir die auf *Phycomyces* und Hefe wirksamen Stoffe, während die auf *Rhizopus* wirksamen nur z. T. vernichtet werden. Wir halten es für möglich, daß bei einer weniger starken Oxydation der Faktor MR nicht oxydiert würde.

Bei unserem Faktor MP hingegen handelt es sich um einen auf *Phycomyces* wirksamen Stoff, der durch H_2O_2 zusammen mit

dem Aneurin und Bios des WKE zerstört wird. Er kann ebensowenig durch Tierkohle-Adsorption vom Aneurin und Bios getrennt werden. Weil unser Faktor MP ganz andere Eigenschaften besitzt als der auf *Aspergillus niger* wirkende Stoff von Nielsen und Hartelius, ist unser mit Fullererde gewonnenes Resultat keine Bestätigung der Trennung, welche Nielsen und Hartelius ausgeführt haben. Dagegen ist für zwei Faktoren sehr wahrscheinlich bewiesen, daß sie nicht mit dem Bios identisch sind und daß Bios nicht auf diese Pilze wirkt.

Schopfer und Jung 1937, 50 zeigen mit den Komponenten des Aneurins, daß diese in entsprechenden Mengen das Vitamin B1 ersetzen können, also dieselbe Wirkung auf *Phycomyces* ausüben. Diese Verbindungen stimmen in ihren physikalisch-chemischen Eigenschaften weitgehend mit denen des Faktors MP überein.

Zusammenfassend läßt sich folgendes sagen: durch Versuche ist erwiesen worden, daß alle bekannten Biospräparate Inositol, Pantothensäure, Biotin ohne Einfluß auf *Phycomyces* sind und demnach mit unserem Faktor MP nicht identisch sein können. Unsere Fullererde-Adsorption liefert den experimentellen Beweis dafür, daß der Faktor MP sehr wahrscheinlich nicht mit dem Hefewuchsstoff von Dagys identisch ist.

Im Weizenkeimextrakt lassen sich nach den bis jetzt ausgeführten Untersuchungen folgende Wirkstoffe unterscheiden:

1. Das Aneurin, nachgewiesen mit dem Tiertest. Es wirkt in kristallisierter Form auf *Phycomyces*.
2. Ein Faktor MP, verschieden von Aneurin, nachgewiesen mit einem Hitzeversuch und in einem Vergleich zwischen einer Aneurin-Standard-Lösung und dem WKE. Er wirkt auf *Phycomyces* und besteht nach Schopfer und Jung 1937 z. T. aus den Aneurin-Komponenten Pyrimidin und Thiazol.
3. Ein Faktor MR, verschieden von den zwei ersten, aktiv auf *Rhizopus*-Arten der zweiten Gruppe. Er bleibt bei einer Tierkohle-Adsorption im Filtrat und wird durch H_2O_2 nur teilweise zerstört.
4. Die Bios-Substanzen (wirken auf Hefe).
5. Die B-Substanzen (= B5) von Nielsen (Dagys).

Aus Tabelle 12 gehen die Eigenschaften hervor, welche die Unterscheidung der einzelnen Faktoren ermöglichen. Die verschiedenen angeführten Eigenschaften bleiben trotzdem unbe-

stimmt genug. Sie sind nützlich, solange sie für zwei Substanzen verschieden sind: auch wenn sie übereinstimmen, kann man trotzdem nicht auf sichere Identität schließen.

Tabelle 12

Eigenschaften:	B 1	MP	MR	Bios	BS
Thermostabilität	+	+++	++	++	(++)
Alkalistabilität	0	(+++)	+	+	(+)
Tierkohleadsorption	+++	+++	± 0	+++	(+ 0)
Fullererdeadsorption	+++	++	± 0	+ 0	(0)
H_2O_2-Beständigkeit	0	0	+++	+	(+++)

0 = null, + = deutlich, ++ = stark, +++ = sehr stark, ( ) = nicht von uns untersucht

Wir stellen die wirksamen und unwirksamen Faktoren zusammen:

Phycomyces:

Wirkstoffe, das Aneurin, der Faktor MP, die Bausteine (Pyrimidin- + Thiazolderivat) des Aneurins, vielleicht identisch mit dem Faktor MP.

Ohne Wirkung, Lactoflavin, gleich Vitamin B 2, Heteroauxin, M-Inosit, Pantothensäure, Biotin und unser Bios — WKE nach Fullererdeadsorption.

Rhizopus-Arten:

Wirkstoff, Faktor MR *(Rhizopus chinensis* und *R. maydis)*.

Ohne Wirkung: Heteroauxin *(R. suinus)*, Lactoflavin *(R. oryzæ)*, Brenztrauben- + Glykolsäure *(R. oryzæ*, negativ auf *R. suinus*, Nielsen), Glykol-, Brenztrauben- und Ascorbinsäure *(R. maydis*, Cholin und Betaïn *(R. chinensis)*, Biosstoffe *(R. maydis)*, Beweis: WKE nach Oxydation.

Giftig: Pyrimidin- und Thiazol-Derivat. *(R. oryzæ, R. suinus, R. maydis, R. chinensis).*

Wir sprechen hier von Giftwirkung im allgemeinen Sinne. [Lohmann (18)]. Wir verstehen darunter überhaupt jede durch Einwirkung von Stoffen verursachte Hemmung des normalen Stoffwechsels.

Saccharomyces cerevisiæ:

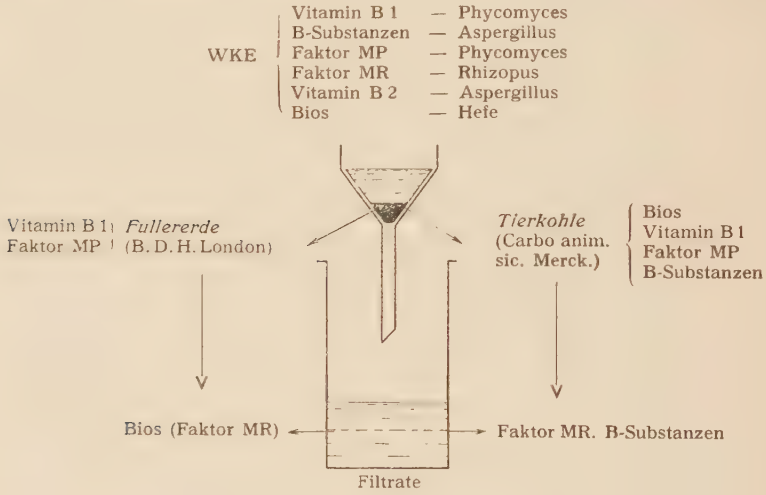
Wirkstoffe: Biosstoffe, WKE nach Fullererde-Adsorption.

Ohne Wirkung: Aneurin und Faktor MP (durch Fullererde entfernt), Faktor MR (im WKE wird das Bios durch Tier-

kohle adsorbiert oder durch H_2O_2 zerstört). Co-Wuchsstoffe, Glykol- und Brenztraubensäure (Nielsen), künstliche Wirkstoffe (Glucose + Ammoniumtartrat, erhitzt, Dagys).

Der Faktor MP kann demnach nicht mit einem der Bios-Stoffe identisch sein. Der Faktor MR könnte nach der letzten Tabelle, in welcher die Eigenschaften analog denen der B 2-Substanzen von Nielsen sind, mit diesen identifiziert werden. Dagegen spricht, daß die Glykol- und Brenztraubensäure, welche auf *Aspergillus niger* wirken, ohne Einfluß auf *R. oryzæ* sind. Dasselbe gilt für *R. maydis* mit Glykol- Brenztrauben- und Ascorbinsäure. Nach Nielsen haben die Glykol- und Brenztraubensäure zusammen in größeren Mengen einen negativen Einfluß auf *R. suinus*.

Fig. 35. Wirkung der Tierkohle und der Fullererde auf die Faktoren desWKE.



A. Zusammenfassung

1. Die Keimungsgeschwindigkeit der *Phycomyces*-Sporen wird durch den WKE nicht beeinflußt.

2. Die Zygotenbildungsschwelle ist festgelegt. Zur Bildung von Zygoten ist mehr Wirkstoff notwendig als für das Luftmyzel. In unserem Versuche war der Schwellenwert der Zygotenbildung 1 ccm WKE 1 : 100, mit einem Trockenrückstand von 8,89 mg.

3. Die Zucker stellen die Hauptmenge der gewöhnlichen Substanzen des WKE dar. Mit Baryt — in methylalkoholischer Lösung — haben wir sie gefällt und so den Extrakt von ihnen gereinigt. Nach dieser Behandlung besaß ein WKE noch den vierten Teil seiner Wirkung auf *Phycomyces*. Zu gleicher Zeit nahm die in ihm enthaltene Trockensubstanz um das Elffache ab.

4. Nach einer Zuckerfällung besitzt der WKE noch seine volle Wirkung des Faktors MR, während, wie es scheint, die Biosstoffe derart z. T. entfernt werden können.

5. Im Extrakt von *Boletus edulis* konnten wir dieselben Wirkstoffeinflüsse (Hefe, *Phycomyces* und *Rhizopus*) nachweisen wie im WKE. Wir können die auf Hefe wirksamen Stoffe durch Oxydation mit H_2O_2 zerstören.

6. *Phycomyces* zeigt in Gegenwart des WKE ein optimales Wachstum zwischen pH 4,6 und pH 7,2.

7. Der ökonomische Koeffizient wurde für *Phycomyces* am 8. Tage zu 0.36 bestimmt. Er ist eine von der Wirkstoffmenge unabhängige Konstante.

8. Weder mit einer Ultraviolett-Bestrahlung, noch mit einer Ultrafiltration konnte eine Veränderung der Wirkstoffe des WKE erzielt werden, welche das Wachstum von *Phycomyces* auslösen.

9. Folgende *Rhizopus*-Arten verhalten sich den Aneurin-Komponenten gegenüber so wie dem Vitamin selber: *R. oryzæ*, *R. chinensis* und *R. maydis*. Die Komponenten wirken auch einzeln negativ, wobei das Pyrimidin-Derivat stärker hemmt.

10. *Rhizopus oryzæ* unterscheidet sich in seinem Verhalten gegenüber verschiedenen Glucose-Mengen stark von *Phycomyces*. Das Maximum an Myzelgewicht wird erst bei 20 % Glucose erreicht. Zwischen $^1/_{10}$ und 2 % ist kein Unterschied im Gewicht festzustellen. Die Glucose-Konzentration unserer Nährlösung ermöglicht ungefähr die Hälfte des Myzelgewichtes der optimalen Konzentration.

11. Für *Rhizopus oryzæ* und *R. suinus* ist das Wachstum als Funktion des Citronensäure-Phosphatpuffers untersucht worden. Es scheint nicht, daß die Citronensäure als C-Quelle der Glucose vorgezogen und damit das Pufferverhältnis gestört wird, obwohl die Citronensäure, wenn sie nur mit der Phosphatkomponente verabreicht wird, assimiliert werden kann. Für beide Pilze ist das Wachstums-Optimum, verglichen mit *Phycomyces*, gegen

den sauren Bereich des Puffers verschoben. Es beginnt bei pH 2.8. Normal wächst *R. oryzæ* bis pH 6.4. *R. suinus* bis pH 6.8.

12. Das Wachstum von *Rhizopus oryzæ* als Funktion der Zeit ist untersucht worden. Das maximale Myzelgewicht wird zwischen dem fünften und siebenten Tage erreicht; die Temperatur ist maßgebend für den Zeitpunkt.

13. Die Asche des WKE ist auf *Rhizopus* ohne Einfluß. Der Faktor MR ist deshalb sehr wahrscheinlich nicht mineralischer Natur.

14. Durch eine Tierkohlebehandlung lassen sich im WKE die auf *Phycomyces* und Hefe wirksamen Stoffe von denen der *Rhizopus*-Arten trennen. Der Faktor MR bleibt im Filtrat. Alle WKE besitzen nach der Tierkohleadsorption einen positiven Einfluß auf die *Rhizopus*-Arten, während die Wirkung auf *Phycomyces* und Hefe fehlt.

15. Wir können bei den *Rhizopus*-Arten zwei Gruppen unterscheiden, die verschieden auf Asparagin reagieren. Bei der asparagin-empfindlichen Gruppe ersetzt eine in N äquivalente Lösung den Wirkstoff. Zur asparagin-empfindlichen Gruppe gehören *R. oryzæ* und *R. suinus*. *Rhizopus chinensis* und *R. maydis* sind fast unempfindlich auf Asparagin.

16. Die Wachstumsförderung durch das Asparagin beruht nicht auf einer auxogenen Verunreinigung, wie die Versuche mit Asparaginhydrochlorid und umkristallisiertem Asparagin zeigen.

17. Mit andern N-Quellen: Ammoniumsulfat, Harnstoff, Glykokoll und Glutaminsäure kann ebenfalls eine Steigerung der Trockensubstanz (*R. oryzæ*) erreicht werden; doch besitzen die Kurven nicht die — für den WKE und das Asparagin — typische Form.

18. Cholin- und Betaïnchlorid sind ohne Einfluß auf *R. chinensis*.

19. Behandelt man den WKE mit Tierkohle, so ist seine Wirkung nicht mehr so stark auf *R. oryzæ* und *R. suinus*. (Die Pilze sind asparagin-empfindlich.) Dasselbe läßt sich mit Asparagin zeigen. Eine N-Bestimmung nach Kjeldahl zeigt, daß rund die Hälfte Asparagin adsorbiert werden kann.

20. Bei einer Tierkohleadsorption im WKE bleibt die MR-Wirkung auf die asparagin-unempfindlichen *Rhizopus*-Arten erhalten. Damit ist bewiesen, daß ein auf *Rhizopus chinensis* und *R. maydis* wirksamer Faktor existiert. Wir nennen ihn MR.

21. Mit Fullererde (B. D. H., London) kann der von der Tierkohle adsorbierte Komplex aufgespalten werden. Es gelingt, die auf *Phycomyces* wirksamen Stoffe (Aneurin und Faktor MP) vom Bios und dem Faktor MR zu trennen. Damit können wir zeigen, daß unser Faktor MP allein sehr wahrscheinlich nicht auf die Hefe wirkt; denn dieser wird von unserer Fullererde adsorbiert, während die auf Hefe wirksamen Stoffe im Filtrat bleiben.

22. Durch eine energische Oxydation mit H_2O_2 konnten wir — in allen daraufhin geprüften Präparaten — die auf *Phycomyces* und Hefe wirksamen Stoffe vollständig zerstören.

23. Der Einfluß des Faktors MR bleibt nach dieser Oxydation bestehen.

24. Die Brenztrauben-, Glykol- und Ascorbinsäure, welche die B-Substanzen von Nielsen ersetzen können, sind unwirksam auf *R. oryzæ* und *R. maydis*. Wir halten deshalb eine Uebereinstimmung unseres Faktors MR mit den B2-Substanzen von Nielsen als nicht demonstriert.

25. Unwirksam auf *Rhizopus chinensis* und *R. maydis* — und deshalb nicht in Frage kommend als Faktor MR — sind die Nicotinsäure, ihr Amid und das Pyridin.

26. Lactoflavin ist unwirksam auf *R. oryzæ*. In größeren Mengen wirkt es schwach hemmend.

27. Die untersuchten und in ihrer Wirkung getrennten Substanzen müssen befähigt sein, die Assimilation der gewöhnlichen Elemente unserer Nährlösung zu erleichtern.

Fig. 1 (Seite 11) *Phycomyces.*
Quantitativer Vergleich des WK mit dem WKE I. 1. WKE $^1/_{100}$. 2. 20 ccm Wasser/160 mg WK. 3. 40 ccm Wasser/160 mg WK. Werte aus einer Wägung.

$^5/_{100}$	$^1/_{10}$	$^5/_{10}$	1	2	4	8 ccm	
11	16	53	78	91	96	103 mg	1.
14	24	38	68	94	104	106 mg	2.
9	15	25	39	75	97	98 mg	3.

Fig. 2 (S. 16) *Phycomyces.*
Glucose variabel 0 bis 1 %, WKE I, $^1/_{100}$. Werte aus einer Wägung.

$^5/_{100}$	$^1/_{10}$	$^5/_{10}$	1	2	4	8 ccm	
—	—	2	3	6	11	20 mg	0 % Glucose
7	10	13	14	17	21	32 mg	0,1 % „
7	11	22	23	26	30	40 mg	0,2 % „
8	11	39	40	42	46	49 mg	0,4 % „
7	11	47	66	78	78	78 mg	0,8 % „
9	12	51	74	80	83	83 mg	1 % „

Fig. 3 (S. 17) *Phycomyces.*
Asparagin variabel: 0,1 bis 4 ‰. WKE I, $^1/_{100}$. Werte aus einer Wägung.

$^5/_{100}$	$^1/_{10}$	$^5/_{10}$	1	2	4	8 ccm	
—	—	—	10	11	11	11 mg	0,1 ‰
—	—	—	13	24	30	34 mg	0,3 ‰
—	—	—	13	24	43	46 mg	0,5 ‰
—	—	—	23	—	71	99 mg	1 ‰
—	—	2	26	45	85	127 mg	2 ‰
—	—	2	25	49	85	140 mg	4 ‰

Fig. 4 (S. 18) *Phycomyces.*
Asparagin und Zeit variabel. WKE I, $^1/_{100}$. 4 ccm WKE konstant. Durchschnittswerte aus zwei Wägungen.

5.	6.	7.	8.	9.	10. Tag	
8	8	9	9	10	11 mg	0,1 ‰
23	27	30	29	28	32 mg	0,3 ‰
25	39	41	44	45	47 mg	0,5 ‰
37	39	46	49	51	51 mg	1 ‰
30	39	46	48	54	54 mg	2 ‰
37	45	46	53	55	54 mg	4 ‰

Fig. 5 (S. 19) *Phycomyces*. WKE nach Zuckerfällung.
1. WKE $^{1}/_{100}$, 2. WKE nach Zuckerfällung. 3. Saccharat viermal mit Methanol gewaschen. 4. Regenerierter Zucker. Werte aus einer Wägung.

$^{5}/_{100}$	$^{1}/_{10}$	$^{5}/_{10}$	1	2	4	8 ccm	
13	20	59	81	94	100	99 mg	1.
5	8	18	29	47	62	70 mg	2.
—	3	10	19	28	50	65 mg	3.
—	—	—	3	9	10	17 mg	4.
8	9	22	40	59	67	70 mg	2. + 3.

Fig. 6 (S. 19) *Phycomyces*.
1. WKE I, $^{1}/_{100}$. 2. WKE I nach Zuckerfällung. Werte aus einer Wägung

$^{5}/_{100}$	$^{1}/_{10}$	$^{5}/_{10}$	1	2	4	8 ccm	
13	19	60	77	84	78	85 mg	1.
4	4	26	38	59	74	70 mg	2.

Fig. 7 (S. 21) *Phycomyces*.
Wachstum unter dem Einfluß des pH. WKE I, $^{1}/_{100}$, 4 ccm konstant. Werte aus einer Wägung.

3,8	4	4,2	4,4	4,6	4,8	5	5,2	5,4	5,6	5,8	pH
4	15	17	91	96	104	95	99	100	99	105	mg
6	6,2	6,4	6,6	6,8	7	7,2	7,4	7,6	7,8	8	pH
110	106	99	112	105	101	102	97	96	82	78	mg

Fig. 8 (S. 22) *Phycomyces*.
Ultraviolettbestrahlung. WKE I, $^{1}/_{100}$. 2. WKE nach 36stündiger Ultraviolettbestrahlung. 3. WKE nach 112stündiger Ultraviolettbestrahlung. Werte aus einer Wägung.

$^{5}/_{100}$	$^{1}/_{10}$	$^{5}/_{10}$	1	2	4	8 ccm	
17	20	61	82	84	87	88 mg	1.
10	17	54	77	90	90	90 mg	2.
11	18	50	73	88	91	95 mg	3.

Fig. 9 (S. 22) *Phycomyces*.
1. WKE I, $^{1}/_{100}$. 2. WKE ultrafiltriert. (zwei Wägungen)

$^{5}/_{100}$	$^{1}/_{10}$	$^{5}/_{10}$	1	2	4	8 cm	
6	11	32	64	81	100	105 mg	1.
4	8	26	55	79	95	95 mg	2.

Fig. 10 (S. 26) *Rhizopus oryzæ.*

Das Aneurin und seine Komponenten. 1. Pyrimidin-Derivat. 2. Thiazol-D. 3. Pyrimidin-D. + Thiazol-D. 4. Vitamin B 1.

0	1	2	10	20	40 γ	
64	32	36	22	28	26 mg	1.
	32	38	—	31	33 mg	
64	41	48	43	26	35 mg	2.
	64	69	50	27	36 mg	
64	31	28	26	26	34 mg	3.
	31	34	28	28	30 mg	
64	30	18	29	25	27 mg	4.
	25	28	25	30	26 mg	

Fig. 11 (S. 26) *R. oryzæ.*

Glucose-Konzentration 0—50 %. Ohne WKE.

0	1/10	2/10	4/10	8/10	1 %	
5	12	20	29	25	23 mg	
5	11	20	27	25	29 mg	
5	11	20	28	24	30 mg	
2	4	5	8	10	20	50 %
27	43	36	61	53	67	— mg
26	37	45	69	58	73	— mg
54	30	53	55	65	60	— mg

Fig. 12 (S. 30) *Rhizopus oryzæ.*

Wachstum unter dem Einfluß des pH. (WKE III, 1/25, 2 ccm konstant.) Durchschnittswerte aus drei Wägungen.

2,2	2,4	2,6	2,8	3	3,2	3,4	3,6	3,8	4 pH	
48	59	93	118	116	108	116	113	106	105 mg	1.
14	50	62	89	95	92	89	84	82	90 mg	2.
4,4	4,8	5,2	5,6	6	6,4	6,8	7,2	7,6	8 pH	
100	100	100	94	89	96	85	68	59	37 mg	1.
81	80	81	76	74	80	69	49	43	— mg	2.

1. Nährlösung, gepuffert — WKE. 2. Nährlösung, gepuffert. Nährlösung allein: 41 mg. Nährlösung + WKE: 120 mg.

Fig. 13 (S. 30) *Rhizopus suinus.*

Wachstum unter dem Einfluß des pH. (WKE III, 1/25, 2 ccm konstant.) Durchschnittswerte aus drei Wägungen.

2,2	2,4	2,6	2,8	3	3,2	3,4	3,6	3,8	4 pH	
—	55	75	80	79	82	80	80	81	82 mg	1.
—	56	65	66	66	65	66	66	64	65 mg	2.

4,4	4,8	5,2	5,6	6	6,4	6,8	7,2	7,6	8 pH	
82	80	75	74	72	73	70	52	20	15 mg	1.
65	62	55	58	51	50	62	62	39	— mg	2.

1. Nährlösung, gepuffert + WKE. 2. Nährlösung, gepuffert. Nährlösung allein: 41 mg. Nährlösung + WKE: 65 mg.

Fig. 14 (S. 31) *R. oryzæ.*
Bestimmung des Wägedatums beim optimalen pH 3. WKE IV, $^1/_{25}$, 2 ccm konstant.

3.	4.	5.	6.	7.	8.	9.	10. Tag	
9	49	78	75	89	90	93	90 mg	1.
18	51	82	93	110	118	126	120 mg	2.
27	77	91	96	101	100	100	97 mg	3.
31	74	94	81	103	100	110	110 mg	4.

1. Nährlösung gepuffert. 2. Nährlösung gepuffert + WKE. 3. Nährlösung. 4. Nährlösung + WKE. Durchschnittswerte aus vier Wägungen.

Fig. 15 (S. 33) *R. oryzæ* und *R. suinus.*
Die Asche des WKE IV. 1. WKE IV, $^1/_{25}$. 2. Die Asche des WKE IV. 3. NaOH + HCL. Durchschnittswerte aus vier Wägungen.

0	$^5/_{10}$	1	2	4	8 ccm		
90	85	101	102	101	107 mg	1.	*R. oryzæ*
90	87	87	86	85	80 mg	2.	
90	89	90	88	90	90 mg	3.	
60	71	73	70	70	75 mg	1.	*R. suinus*
60	56	58	60	62	56 mg	2.	
60	59	58	56	51	49 mg	3.	

Fig. 16 (S. 35) *R. oryzæ.*
1. WKE IV, $^1/_{25}$. 2. WKE IV, $^1/_{25}$ + Tierkohle. Durchschnittswerte aus vier Wägungen.

0	$^5/_{10}$	1	2	4	8 ccm	
55	62	71	69	69	73 mg	1.
55	84	93	107	114	129 mg	2.

Fig. 17 (S. 38) *R. oryzæ.*
Asparagin variabel 0 — 4 ‰. WKE III, $^1/_{25}$. Durchschnittswerte aus vier Wägungen.

0	$^5/_{10}$	1	2	4 ccm	
—	5	9	15	29 mg	0,0 ‰
9	13	16	23	38 mg	0,1 ‰
41	42	43	53	59 mg.	0,5 ‰
45	53	53	73	72 mg	1,0 ‰
77	80	97	104	118 mg	2,0 ‰
151	155	183	176	176 mg	4,0 ‰

Fig. 18 (S. 39) *R. oryzæ.*

1. WKE IV, $^1/_{25}$ + Tierkohle. 2. Asparagin äquivalent. Durchschnittswerte aus drei Wägungen.

0	$^5/_{10}$	1	2	4	8 ccm	
96	98	104	109	111	125 mg	1.
96	96	98	111	119	136 mg	2.

Fig. 19 (S. 40) *Rhizopus oryzæ.*

1. Asparagin (311 mg/100 ccm) und 2. Asparagin-Hydrochlorid. (386 mg/100 ccm). Durchschnittswerte aus drei Wägungen.

0	$^5/_{10}$	1	2	4	8 ccm	
75	83	87	102	108	165 mg	1.
75	83	86	98	110	122 mg	2.

Fig. 20 (S. 41) *Rhizopus oryzæ.*

1. Asparagin 250 mg. 2. Ammoniumsulfat 235 mg. 3. Harnstoff 107 mg. 4. Glykokoll 267 mg. 5. Glutaminsäure 521 mg. Mengen gelöst in 100 ccm Wasser. Durchschnittswerte aus vier Wägungen.

0	$^5/_{10}$	1	2	4	8 ccm	
72	69	78	80	87	103 mg	1.
72	76	86	83	78	78 mg	2.
72	77	91	87	63	59 mg	3.
72	79	87	88	86	65 mg	4.
72	77	82	81	67	53 mg	5.

Fig. 21 (S. 43) *Rhizopus oryzæ.*

1. Asparagin. 2. Asparagin + Hitze. 3. Asparagin + Tierkohle. 4. Asparagin + H_2O_2. 5. WKE V, $^1/_{25}$. 6. WKE V + Hitze. 7. WKE V + Tierkohle. 8. WKE V + H_2O_2. Durchschnittswerte aus drei Wägungen.

0	$^5/_{10}$	1	2	4	8 ccm	
100	101	107	117	128	154 mg	1.
100	105	112	122	130	160 mg	2.
100	103	105	107	112	122 mg	3.
100	107	108	112	114	120 mg	4.
100	106	110	115	120	132 mg	5.
100	102	107	112	122	145 mg	6.
100	104	106	108	111	120 mg	7.
100	108	109	110	111	112 mg	8.

Fig. 22 (S. 43) *Rhizopus oryzæ.*

I. WKE V, $^1/_{25}$. II. WKE V + gewaschene Tierkohle. Durchschnittswerte aus drei Wägungen.

0	$^5/_{10}$	1	2	4	8 ccm	
100	110	114	121	140	168 mg	I.
100	105	112	114	121	136 mg	II.

Fig. 23 (S. 44) *Rhizopus maydis* und *Rhizopus chinensis*.
1. WKE V, $^1/_{25}$. 2. WKE V + Tierkohle. 3. Asparagin in N äquivalent. Durchschnittswerte aus drei Wägungen.

0	$^5/_{10}$	1	2	4	8 ccm	
32	60	65	66	66	70 mg	1.
32	44	47	55	62	56 mg	2.
32	31	31	32	37	40 mg	3.
30	55	55	67	70	80 mg	1.
30	42	48	55	65	67 mg	2.
30	31	32	32	36	38 mg	3.

Fig. 24 (S. 46) Hefe.
Absorptionsprozente der Verdünnungskurve.

0	10	20	30	70	100	150	220 ccm
76	60	45	37	20	15	10	8 %

Fig. 25 (S. 46) Hefe.
WKE III, $^1/_{100}$ nach Fuller erde-Adsorption: a) Absorptionsprozente. b) mg Hefe.

0	$^1/_{10}$	$^3/_{10}$	$^5/_{10}$	1	2	3	5	ccm	
0	2	6	10	39	76	79	75	%	a)
0	—	—	—	14	40	40	42	mg	b)

Fig. 26 (S. 48) *Phycomyces*.
pH-Adsorption, Fullererde, im WKE III. 1. 8 ccm Extrakt. 2. 2 ccm Extrakt = optimale Menge. Durchschnittswerte aus zwei Wägungen.

Kontr.	2,2	3	4	4,6	5	6	7	8 pH	
80	19	12	12	15	14	18	21	30 mg	1.
70	8	4	5	5	—	7	4	12 mg	2.

Fig. 27 (S. 49) Hefe.
pH-Adsorption, Fullererde, im WKE III. Extrakt $^1/_{100}$. Die Zahlen sind Mittelwerte aus allen Pufferlösungen (pH 2,2 bis 8), da ihre Resultate innerhalb der Fehlergrenze übereinstimmen.

0	$^5/_{100}$	$^1/_{10}$	$^3/_{10}$	$^5/_{10}$	1	2	3	5	7	9 ccm
—	—	8	9	12	16	38	40	44	50	50 mg

Fig. 28 (S. 49) *Rhizopus oryzæ*.
WKE III nach gepufferter Fullererdeadsorption. Extrakt $^1/_{100}$, 8 ccm konstant. Werte aus zwei Wägungen.

Ungepuffert	2,2	3	4	4,6	5	6	7	8 pH
85	108	112	113	113	108	112	96	98 mg

Fig. 29 (S. 54) Hefe.

1. WKE VII, $^1/_{100}$. 2. WKE VII + Inversion + Zuckerfällung (Zf.). 3. WKE VII + Inversion + Zf. + Oxydation. Durchschnittswerte aus zwei Wägungen.

0	1	2	4	8 ccm		
3	55	70	71	72 %	Absorption	1.
3	4	12	57	65 %	„	2.
2	—	—	—	2 %	„	3.

Fig. 30 (S. 55) *R. oryzæ.*

1. WKE IV, $^1/_{25}$. 2. WKE IV + Tierkohle. 3. WKE IV + Oxydation. Durchschnittswerte aus vier Wägungen.

0	$^5/_{10}$	1	2	4	8 ccm	
61	62	71	69	69	73 mg	1.
61	84	93	107	114	129 mg	2.
61	52	61	67	72	81 mg	3.

Phycomyces mit 2. und 3. ohne Wachstum.

Fig. 31 (S. 56) *Phycomyces.*

Vergleich der Extrakte IV und V, $^1/_{100}$. Durchschnittswerte aus zwei Wägungen.

0	$^5/_{10}$	1	2	4	8 ccm	
0	50	76	86	92	98 mg	IV.
0	42	72	86	95	98 mg	V.

Fig. 32 (S. 57) *Rhizopus maydis.*

1. WKE VII, $^1/_{25}$. 2. WKE VII + Inversion + Zf. 3. WKE VII + Inversion + Zf. + Oxydation. Durchschnittswerte aus drei Wägungen.

0	$^5/_{10}$	1	2	4	8 ccm	
27	51	53	51	56	64 mg	1.
27	52	58	55	42	39 mg	2.
27	33	43	57	62	59 mg	3.

Fig. 33 (S. 58) *Phycomyces* und *Rhizopus oryzæ.*

Extrakt aus *Boletus edulis.* Eine Wägung.

0	$^1/_{10}$	$^3/_{10}$	$^5/_{10}$	1	2	3	4	6	8	10 ccm	
—	10	25	38	58	86	95	—	107	—	125 mg	1.
62	70	68	78	97	95	109	—	127	—	129 mg	2.
0	14	—	46	66	74	—	75	—	79	mg	3.

1. *Phycomyzes.* 2. *Rhizopus.* 3. *Phycomyces* mit WKE, als Vergleich.

Fig. 34 (S. 60) *Rhizopus oryzæ.*

Lactoflavin. Durchschnittswerte aus zwei Wägungen.

0	1	3	5	10	20	30	60	100 γ
73	68	60	55	53	50	50	52	52 mg

C. Literaturverzeichnis

1. Almoslechner, E. Die Hefe als Indikator für Wuchsstoffe. Planta, 1934, 22, 515.
2. Baba Tamesi. Die Fällung von Zuckern mit methylalkoholischem Bariumhydroxyd. Biochem. Zeitschr. 1935, 275, 253.
3. Barbieri, M. N. A. Analyse immédiate du blé. C.-r. Acad. Sci., Paris 1914, 159, 432.
4. Bernhauer, K. und Thole, H. Ueber die Säurebildung durch Rhizopus-Arten I. Biochem. Zeitschr. 1936, 287, 167.
5. Boysen-Jensen, P. Ueber die Bildung und biologische Bedeutung des Wachstumsregulators bei Aspergillus niger. Biochem. Zeitschr. 1932, 250, 270.
6. Burgeff, H. Pflanzliche Avitaminose und ihre Behebung durch Vitaminzufuhr. Ber. Deut. Bot. Ges. 1934, 52, 384.
7. Bünning, E. Wachstum und Stickstoffassimilation bei Aspergillus niger unter dem Einfluß von Wachstumsregulatoren und von Vitamin B. Ber. Deut. Bot. Ges. 1934, 52, 423.
8. Dagys, J. Wuchsstoffe der Mikroorganismen in embryonalen Geweben und im Blutungssafte. Protoplasma 1935, 24, 16.
9. — Die Hefewuchsstoffe in Knospen und Blättern. Protoplasma, 1936, 26, 20.
10. — Die Hefewuchsstoffe in Maiskeimlingen. Protoplasma, 1937, 28. 205.
11. Frankfurt, S. Zur Kenntnis der chemischen Zusammensetzung des ruhenden Keimes von Triticum vulgare. Landw. Versuchsstationen, 1896, 47, 449.
12. Karrer, P. und Salomon, H. Bestandteile von Weizenkeimlingen I. Ueber neue Verbindungen aus den unverseifbaren Anteilen des Weizenkeimlingsöls. Hel. Chim. Acta, 1937, 20, 424.
13. Kerl, J. Ueber Regenerationsversuche an Fruchtkörpern und andere entwicklungsphysiologische Untersuchungen bei Pyronema confluens. Zeitschrift für Bot., 1937, 31, 129.
14. Knigth, B. C. J. G. The nutrition of Staphylococcus aureus; nicotinic acid and vitamin B 1. Biochemic. J., 1937, 31, 731.
15. — The nutrition of Staphylococcus aureus. The activities of nicotinamide, Aneurin (Vitamin B 1) an related compounds. Biochemic. J., 1937, 31, 966.
16. Kögl, F. Wirkstoffprinzip und Pflanzenwachstum. Die Naturwissenschaften, 1937.
17. Kögl, F. und Fries, N. Ueber den Einfluß von Biotin, Aneurin und Meso-Inosit auf das Wachstum verschiedener Pilzarten. Hoppe-Seylers Zeitschr. f. physiologische Chemie, 1937, 249, 93.

18. Lohmann, G. Nährstoff- und Giftwirkung bei *Aspergillus niger*. Archiv für Mikrobiologie. 1934. 5. 31.

19. Narayanan, B. T. The chemical Investigation of „Bios". Biochem. J.. 1930. 24. 6.

20. Nielsen, N. Unter-uchungen über einen neuen wachstumsregulierenden Stoff: Rhizopin. Jahrbuch für wissensch. Bot.. 1930. 73. 125.

21. — The effect of Rhizopin on the production of matter of Aspergillus niger. C. R. Lab. Carlsberg. 1931. 19. 1.

22. — Ueber das Vorkommen von Wuchsstoffen bei Boletus edulis. Biochem. Zeitschr., 1932, 249. 196.

23. — und Hartelius, V. The separation of growth promoting substances. C. R. Lab. Carlsberg. 1932. 19. 1.

24. — und — . Ueber die Bildung eines Wuchsstoffes Gruppe B auf chemischem Wege. Biochem. Zeitschr.. 1932. 256. 2.

25. — und — . Investigations of the growth of Aspergillus niger at different hydrogen ion concentrations. with and without the addition of growth promoting substance B. C. R. Lab. Carlsberg. 1933. 19. 1.

26. — Investigations on the assimilation of growth substances by yeast from wort. C. R. Lab. Carlsberg. 1934. 20. 1.

27. — und Hartelius, V. Ueber die Co-Wuchsstoffwirkung einiger Metallmischungen. Biochem. Zeitschr.. 1935. 276. 183.

28. — und — . Chemistry of growth substance B. Nature. 1936. 138. 203.

29. — und — . Ueber die Trennung der auf die Stoffproduktion der Hefe und Schimmelpilze einwirkenden Wuchsstoffe. C. R. Lab. Carlsberg, 1937. 22. 1.

30. Okunuki, Kazuo. Ueber die Beeinflussung des Wachstums der Schimmelpilze durch die von Rosahefe gebildeten Stoffe. Jap. Journal of Botany. 1931, 5, 401.

31. Ronsdorf, L. Vergleichende Untersuchungen über die Wirkung verschiedener Wuchsstoffe auf das Wachstum einiger Pilze. Archiv für Mikrobiologie. 1935, 6. 309.

32. Schopfer, W. H. Sur une substance active jointe au maltose. Action physiologique. C. R. soc. phys. nat. Genève. 1930. 47. 165.

33. Schopfer, W. H. Sur l'emploi des maltoses du commerce et du maltose de synthèse dans les recherches biologiques. Hel. Chim. Acta. 1931. 14. 1067.

34. — Recherches sur le facteur de croissance contenu dans le germe de blé. Bull. Soc. bot. suisse. 1932. 41. 335.

35. — Sur le facteur accessoire de croissance de microorganisme contenu dans le germe de blé; son action sur la sexualité de Phycomyces. C. R. Soc. phys. hist. nat., Genève. 1932. 49. 70.

36. — Versuche über die Wirkung von reinen kristallisierten Vitaminen B auf Phycomyces. Ber. Deutsch. Bot. Ges.. 1934. 52. 308.

37. — Sur le facteur de croissance du germe de blé. Son extraction par l'acétate de plomb et son action sur un champignon. Archiv für Mikrobiologie, 1934, 5, 502.

38. — Les vitamines cristallisées B commes hormones de croissance chez un microorganisme (Phycomyces). Archiv für Mikrobiologie, 1934, 5, 511.
39. — Etude sur les facteurs de croissance. Sur multiplicité des facteurs agissant sur les mucorinées. Bull. Soc. bot. suisse, 1934, 43, 389.
40. — Recherches sur l'utilisation des facteurs de croissance par un microorganisme. La synthèse biologique des facteurs de croissance. Archiv für Mikrobiologie, 1935, 6, 196.
41. — und Jung, A. Facteurs de croissance et vitamines chez les plantes. Recherches sur l'action des extraits d'Aspergillus sur le dévelopement de Phycomyces. Archiv für Mikrobiologie, 1935, 6, 334.
42. — et — . Recherches sur la synthèse de la vitamine B 1 par Phycomyces. Archiv für Mikrobiologie, 1935, 6, 345.
43. — Etude sur les facteurs de croissance. Action de la vitamine cristallisée B 1 et de l'extrait de germes de blé sur Rhizopus et d'autres Mucorinées. Zeitschr. für Vitaminforschung, 1935, 4, 187.
44. — Vitamines et facteurs de croissance chez les plantes. Contribution à l'étude quantitative des conditions d'action des facteurs de croissance sur Phycomyces. Archiv für Mikrobiologie, 1935, 6, 510.
45. — Vitamine und Wachstumsfaktoren bei den Pflanzen. Der Gehalt an Wachstumsfaktoren der Sporen von Phycomyces. Ber. Deutsch. Bot. Ges., 1935, 80, 466.
46. — et Jung, A. Détermination de la teneur en vitamine B 1 d'un de germe de blé. C.-r. Soc. Biol., Paris, 1936, 122, 249.
47. — et Moser, W. Recherches sur la concentration et la séparation des facteurs de croissance de microorganisme contenus dans le germe de blé. Protoplasma, 1936, 26, 538.
48. — Le facteur M de mucorinées est-il analogue à l'hormone de division cellulaire des méristèmes (ou à l'hormone réglant la production de matière de ces cellules?). Protoplasma, 1936, 27, 131.
49. — et Jung, A. Vitamines et facteurs de croissance chez les plantes. Recherches sur l'activité des produits d'oxydation de la vitamine B 1. Archiv für Mikrobiologie, 1936. 7, 571.
50. — et — . L'action des produits de desintégration de l'aneurine sur Phycomyces. Le second facteur de croissance des mucorinées. C.-r. Acad. Sci., Paris, 1937, 204, 1500.
51. — La forme de la plante. Quelques facteurs chimiques de sa genèse et de son déterminisme. Actes de la Soc. Helv. des Sciences Nat., Genève, 1937.
52. Stieger, A. Untersuchungen über die Verbreitung des Asparagins, des Glutamins, des Arginins, des Allantoins und der Hemicellulose in den Pflanzen. Straßburg, 1913.
53. Wassink, E. C. Begrenzende Bedingungen bei der Atmung von Phycomyces. Rec. d. travaux bot. néerl., 1934, 31, 583.
54. Wildiers, E. Nouvelle substance indispensable au développement de la levure. La Cellule, 1901, 18, 311.
55. Yoschimura, K. Beitrag zur Kenntnis der Zusammensetzung der Malzkeime. Biochem. Zeitschr., 1911, 31, 221.

Lebenslauf

Ich wurde am 25. Januar 1910 in Lotzwil (Kt. Bern) geboren. Aufgewachsen bin ich in Solothurn, wo ich die Primar- und Sekundarschule besuchte. Anschließend war ich ein Jahr in der französischen Schweiz. Von 1927—1931 durchlief ich die Lehrerbildungsanstalt der Kantonsschule Solothurn und wurde 1931 zum Primarlehrer patentiert. Als solcher amtete ich 2 Jahre in der solothurnischen Gemeinde Oekingen, worauf ich mich im Sommersemester 1933 an der Philosophischen Fakultät II der Universität Bern immatrikulieren ließ. 1936 erwarb ich das solothurnische Bezirkslehrerpatent nach technischer Richtung. Hierauf setzte ich meine Studien in Bern fort und bestand am 25. Mai 1939 das Doktorexamen in den Fächern Botanik, Chemie und Geologie.